

**TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE
NANDROLONA PREJUDICA O RELAXAMENTO VASCULAR
EM RATAS SEDENTÁRIAS E SUBMETIDAS A
TREINAMENTO FÍSICO**

IZABELA FACCO CALIMAN

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, março de 2017

TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA PREJUDICA O RELAXAMENTO VASCULAR EM RATAS SEDENTÁRIAS E SUBMETIDAS A TREINAMENTO FÍSICO

IZABELA FACCO CALIMAN

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 31 de março de 2017

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli – Orientadora, UFES

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade - UVV

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo – Unimontes

Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo - UFES

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos – UFES

Prof. Dr. Alessandra Simão Padilha
Coordenadora do PPGCF – UFES

Caliman, Izabela Facco 1989

Tratamento crônico com decanoato de nandrolona prejudica o relaxamento vascular em ratas sedentárias e submetidas a treinamento físico [Vitória] 2017.

160p., 29,7 cm (UFES, Dr. Ciências Fisiológicas, 2017).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Decanoato de Nandrolona 2. Esteroides Anabólicos Androgênicos 3. Reatividade Vascular 4. Treinamento Físico 5. Óxido Nítrico

Oração Nossa

“Senhor ensina-nos a orar, sem esquecer o trabalho.

...

...

...

A progredir, sem perder a simplicidade.

A semear o bem, sem pensar nos resultados...

...

A marchar para frente, sem contar os obstáculos.

...

A escutar, sem corromper os assuntos.

A falar, sem ferir.

A compreender o próximo, sem exigir entendimento...

...

*A dar o melhor de nós, além da execução do próprio dever, sem cobrar
taxas de reconhecimento...*

*Senhor, fortalece em nós, a paciência para com as dificuldades dos
outros, assim como precisamos da paciência dos outros, para com as
nossas próprias dificuldades...*

...

*Auxilia-nos, sobretudo, a reconhecer que a nossa felicidade mais alta
será, invariavelmente, aquela de cumprir seus desígnios onde e como
queiras, hoje, agora e sempre”.*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Estes anos voltados ao meu doutorado foram uma longa trajetória de desafios, aprendizado e amadurecimento. Terminei este projeto “compreendendo que produzir conhecimento vence barreiras e aproxima as pessoas de um mundo melhor” - frase de uma grande amiga (Pollyana Dalpiaz)

Como todo projeto, este foi realizado com muito esforço e dedicação, não só minha, mas de muitos outros que me ajudaram e encorajaram ao longo do caminho. A estes, só me cabe uma palavra: Obrigada!

À Deus, pela presença constante em minha vida, refúgio e fortaleza nos momentos difíceis e fonte de fé e esperança; Ele cuida e guia os meus passos, mostrando-me o caminho.

À minha família, meu bem maior. Muito mais durante o período do doutorado, souberam entender minha ausência e, mesmo na distância nunca deixaram de transmitir seu amor e se fazerem presentes. Especialmente aos meus pais e meu irmão, pelo apoio incondicional e por todos os sacrifícios que permitiram que eu chegasse até aqui. Vocês me ensinaram a perseverança e garra, ciência alguma conseguiria me ensinar isso. Obrigada por tudo que fizeram por mim e que contribuíram para eu estar aqui hoje. Minha família, minha vida.

Ao Cris, amor da minha vida, daqui até a eternidade. Obrigada por toda ajuda, sem a qual não teria conseguido terminar esse doutorado, compreensão, e, sobretudo paciência. Você me ajudou em todas as etapas desta caminhada – pessoal e profissionalmente. Como colaborador do projeto nandrolona estive presente na análise dos dados, escrita do artigo, até no treinamento dos animais você ajudou! Durante o doutorado sanduíche você foi o responsável por me apresentar uma nova área de pesquisa, sempre com boas ideias e bons conselhos científicos; por toda disposição em ensinar, ajudar diretamente nos experimentos e na compreensão dos resultados, meu muito obrigada!! Com você iniciei uma nova vida, cheia de desafios e obstáculos, cheia de sorrisos e vitórias. Obrigada por entender os meus delírios sem nunca me abandonar, acrescentar razão e beleza aos meus dias, pela sua presença

e apoio em tudo que fiz e faço até hoje. Além de marido, companheiro e amigo, é um colega de profissão que admiro e me espelho muito. Obrigada por me fazer sentir tão amada. A você, todo o meu amor ontem, hoje e sempre.

A Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli, que permitiu o desenvolvimento dessa tese em seu laboratório. Desde a iniciação científica, se fez uma orientadora presente e dedicada, confiando sempre em meu trabalho. Obrigada por acreditar no meu potencial como pesquisadora e por estimular o meu desenvolvimento científico e qualificação profissional, mesmo que isso significasse a minha ausência do laboratório e o meu envolvimento em diferentes projetos/linhas de pesquisa. Sempre nos estimulou a aproveitar as oportunidades que a vida nos oferece, nunca medindo esforços para conciliar os interesses dos alunos face aos obstáculos da vida científica e acadêmica. Sinto literalmente que todos nós somos seus “filhos” científicos. Mantenho guardado no peito o bem querer e cuidado comigo durante esses anos.

Aos amigos do laboratório de hipertensão experimental, agradeço pela disposição em ajudar, pelo convívio e momentos compartilhados no LHE. Aline, Polyana e Karine, agradeço pela amizade e parceria em todas as fases desse trabalho. Apesar de não estarem envolvidas diretamente no mesmo projeto, sempre me apoiaram - seja com palavras ou com ações. Obrigada pelas conversas motivadoras que me fizeram acreditar que tudo seria possível e me fizeram seguir em frente. Vocês são grandes pesquisadoras, grandes companheiras de trabalho e grandes amigas que o LHE me deu de presente!!

Glaucinha e Antônio, “meus ICs”, não tenho palavras para agradecer a ajuda durante os experimentos. Fico tão feliz e orgulhosa em ver a trajetória de vocês – desde a chegada no LHE, pleiteando uma vaga de iniciação científica até a evolução e amadurecimento com o mestrado – e saber que contribuí um pouquinho. Saibam que vocês contribuíram muito mais para que os experimentos do meu projeto pudessem sair do papel. Antônio, obrigada especialmente pela ajuda com os experimentos adicionais para que pudéssemos responder os revisores do artigo. Obrigada por estarem sempre comigo, seja no laboratório, seja na vida. Vocês são além de grandes amigos, grandes colaboradores.

Girlândia, Andrews e Eweline - colegas com os quais compartilhei experimentos que resultaram nas nossas teses de doutorado - obrigada pela ajuda com o tratamento e o treinamento dos animais, com os protocolos experimentais e pelos momentos de convivência no laboratório. Phablo e Marcos, agradeço pelos momentos de descontração e risadas, por todo incentivo e disposição em sempre ajudar. Aos alunos de iniciação científica Edgar, Mariana, Marília, Ana Paula, Mayara e Nara, obrigada por toda a ajuda com o treinamento e tratamento dos animais e coleta de tecidos para os experimentos adicionais direcionados à submissão do artigo. Aos demais alunos que passaram pelo LHE, agradeço pela disposição em ajudar e pela contribuição para o meu aprendizado.

Aos Profs. da IUSM Dr. Andrei Molosh e Dr. Philip Johnson, que me acolheram em seus laboratórios durante o período que estive nos EUA. Agradeço ao Andrei por ter dito o primeiro “sim”, me aceitado como aluna (mesmo sem me conhecer pessoalmente) e aberto as portas do seu laboratório para que aprendesse eletrofisiologia. Ao Johnson, que me acolheu como sua própria aluna de doutorado, não mediu esforços para que me sentisse “parte do grupo” e para que desenvolvesse projetos que refletiam os meus interesses científicos. Apesar de todas as dificuldades, frustrações, desapontamentos, lágrimas e (algumas vezes) desespero, valeu a pena. Valeu a pena o contato, aprendizado e imersão em um ambiente de pesquisa dinâmico, intenso, e muitas vezes agressivo – um modelo muito diferente do que até então eu havia experienciado; valeu a pena a oportunidade de desenvolver projetos e experimentos que, devido a limitações técnicas e financeiras, são tão distantes da realidade da pesquisa no nosso país; valeu a pena o aperfeiçoamento de uma nova língua, o conhecimento de uma nova cultura, de novos lugares; valeu a pena o crescimento como pessoa, como pesquisadora. Afinal, nenhum sonho é alcançado sem esforço. Ao olhar para trás percebo que, apesar de todos os obstáculos, foram muitas vitórias, sorrisos e comemorações. Obrigada!

A todos os colegas e amigos que fiz durante meu doutorado sanduiche no exterior e que dispuseram seu tempo para me ensinar, proporcionar suporte e companhia: Liang Ping, Jodi Burke, Erik Dustrude, Stephanie Fitz, Lauren Federici, Melissa Haulcomb, David Haggerty, Laura Mesquita e em especial Dave Arendt e Aline Abreu. Dave, o nosso “american friend”, a quem sempre nos dirigíamos para fazer as perguntas mais

grotescas sobre a cultura americana, o significado das palavras que não estavam escritas no dicionário, companheiro das “happy hours”, das reclamações de laboratório, das risadas. Aline, quem diria que de todos os lugares e datas, a gente iria decidir fazer o doutorado sanduiche no mesmo laboratório e durante o mesmo período? Mais um exemplo que Deus sabe de todas as coisas e guia nossos passos. Ter você por perto, para poder conversar livremente, discutir experimentos, ajudar na adaptação dessa forma diferente de fazer pesquisa, reclamar sobre as mesmas coisas, contar fofocas, rir à toa... foi um conforto e sustendo durante essa jornada. Sempre me ofereceu suporte para que não me sentisse sozinha, mesmo longe das pessoas queridas do Brasil e sempre estive “junto” para o que precisasse, seja dentro ou fora do laboratório.

Aos Profs. Sônia Gouvêa, Suely Gomes de Figueiredo e Tadeu Ugerre de Andrade, pessoas excepcionais com quem tive a oportunidade de conviver durante esses anos. Obrigada por todo apoio, ensinamentos e opiniões. Sempre presentes e dispostos a colaborar com extrema competência e generosidade, saibam que vocês são exemplo profissional.

À Thais Faria, pela ajuda com o Western Blot, discussões e boas ideias.

Aos professores do PPGCF, demais alunos, secretários e funcionários, por compartilharem os momentos durante esses anos, o conhecimento e a troca de experiências.

À CAPES e FAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, embora não nomeados, se somaram para tornar possível este momento, meu reconhecido e carinhoso OBRIGADA!!!

Tenho que confessar que já estou com saudades dessa fase...

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAA)	19
1.1.1 Histórico do Desenvolvimento e Uso dos EAAs	21
1.1.2 Classificação e Mecanismo de Ação dos EAA	25
1.1.3 Efeitos Adversos do abuso dos EAA	30
1.2 TÔNUS VASCULAR, FUNÇÃO ENDOTELIAL E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	35
1.2.1 Mecanismos Fisiológicos da Regulação Vascular	35
1.2.2 Hormônios Sexuais, EAA e Função Vascular	42
1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E EAA	46
1.4 JUSTIFICATIVA	51
2. OBJETIVOS	54
2.1 OBJETIVO GERAL:	54
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 ANIMAIS	55
3.2 ESTUDO 1 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM DN EM RATAS INTACTAS SEDENTÁRIAS E TREINADAS	55
3.2.1 Protocolo estudo 1	56
3.3 ESTUDO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E HORMONAIS E DO PERFIL DE REATIVIDADE VASCULAR ENTRE FÊMEAS TRATADAS COM DN E FÊMEAS OVARIETOMIZADAS	57
3.3.1 Protocolo estudo 2	57
3.4 ESTUDO 3 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM DN EM RATAS OVARIETOMIZADAS SEDENTÁRIAS E TREINADAS	58
3.4.1 Protocolo estudo 3	59
3.5 TRATAMENTOS	60
3.6 PROCEDIMENTOS GERAIS	61
3.6.1 Avaliação de ganho de peso, ingestão de ração, índice de adiposidade e peso dos órgãos	61
3.6.2 Determinação do ciclo estral	61
3.6.3 Ovariectomia	63
3.6.4 Dosagens dos hormônios sexuais	64
3.6.5 Treinamento físico	64
3.6.6 Reatividade Vascular do Leito Mesentérico (LVM)	66

3.6.6.1 Protocolos de estudo da reatividade vascular	68
<i>Reatividade vascular à Acetilcolina (ACh) na ausência de inibidores farmacológicos</i>	68
<i>Avaliação da participação da via do NO sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio</i>	69
<i>Avaliação da participação dos PGs derivados da via do ácido araquidônico-COX e do EDHF sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio...</i>	69
3.6.7 Western Blot.....	70
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
4. RESULTADOS	75
4.1 ESTUDO 1: EFEITOS DO TRATAMENTO COM DN EM FÊMEAS SEDENTÁRIAS OU TREINADAS	75
4.1.1 Características biométricas e hormonais	75
4.1.2 Efeitos do tratamento com DN sobre a função vascular do leito mesentérico isolado	77
<u>4.1.2.1 Avaliação da participação do NO na resposta de relaxamento dependente do endotélio</u>	<u>79</u>
<i>Efeito da inibição da iNOS</i>	80
<i>Efeito da inibição da NOS</i>	82
<u>4.1.2.2 Avaliação da participação do EDHF e dos PGs na resposta de relaxamento dependente do endotélio</u>	<u>84</u>
<i>Efeito da inibição da NOS e PGs – avaliação da participação do EDHF</i>	84
<i>Efeito da inibição dos PGs</i>	86
4.1.3 Efeitos do tratamento com DN sobre a intensidade das bandas proteicas da NOS, Akt e NADPH oxidase nos LVMs de fêmeas intactas sedentárias ou treinadas.....	87
4.2 ESTUDO 2: COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E HORMONAIS E PERFIL DE RESPOSTA VASCULAR DE FÊMEAS INTACTAS TRATADAS COM DN E FÊMEAS OVARIETOMIZADAS	89
4.2.1 Comparação entre as características biométricas e hormonais de fêmeas intactas tratadas com DN e fêmeas ovariectomizadas	89
4.2.2 Comparação entre a função vascular do leito mesentérico isolado de fêmeas intactas tratadas com DN e fêmeas OVX.....	91
<i>Investigação dos mecanismos envolvidos no prejuízo da reatividade vascular induzida pelo tratamento com DN e ovariectomia (fêmeas com deficiência nos níveis circulantes de estradiol)</i>	92
4.3 ESTUDO 3: EFEITOS DO TRATAMENTO COM DN EM FÊMEAS OVARIETOMIZADAS SEDENTÁRIAS OU TREINADAS	95
4.3.1 Características biométricas e hormonais	95

4.3.2 Efeitos do tratamento com DN sobre a função vascular do leito mesentérico isolado	97
<u>4.3.2.1 Avaliação da participação do NO na resposta de relaxamento dependente do endotélio</u>	<u>99</u>
<i>Efeito da inibição da NOS</i>	<i>99</i>
<u>4.3.2.2 Avaliação da participação do EDHF e dos PGs na resposta de relaxamento dependente do endotélio</u>	<u>101</u>
<i>Efeito da inibição da NOS e PGs – avaliação da participação do EDHF ...</i>	<i>101</i>
<i>Efeito da inibição dos PGs</i>	<i>102</i>
4.3.3 Efeitos do tratamento com DN sobre a intensidade das bandas proteicas da NOS, Akt e NADPH oxidase nos LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias ou treinadas.....	103
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÃO.....	120
7. REFERÊNCIAS.....	121
8. ANEXOS	148
8.1 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO RELACIONADO AO TEMA DA TESE ..	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características biométricas e níveis hormonais dos grupos veículo sedentário (VEH + SED), Decanoato de Nandrolona (DN) sedentário (DN + SED), veículo treinado (VEH + EXC) e DN treinado (DN + EXC).....	77
Tabela 2. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na ausência de inibidores.....	79
Tabela 3. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de AG..	81
Tabela 4. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME.....	83
Tabela 5. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME + INDO.....	85
Tabela 6. Características biométricas e níveis hormonais dos grupos SHAM (SHAM), SHAM tratado com Decanoato de Nandrolona (SHAM + ND) e ovariectomizado (OVX)	91
Tabela 7. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas SHAM, SHAM+DN e OVX na ausência e presença de inibidores farmacológicos.	95
Tabela 8. Características biométricas e níveis hormonais dos grupos ovariectomizados veículo sedentário (OVEH + SED), Decanoato de Nandrolona (DN)-	

sedentário (ODN + SED), veículo treinado (OVEH + EXC) e DN treinado (ODN + EXC).....97

Tabela 9. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias (OSED) ou treinadas (OEXC) tratadas com decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na ausência de inibidores.....98

Tabela 10. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias (OSED) ou treinadas (OEXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME.100

Tabela 11. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias (OSED) ou treinadas (OEXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME + INDO.102

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Pontos temporais na evolução do uso ilícito de EAA	24
Figura 2. Estruturas químicas da testosterona e seus metabolitos e exemplos representativos de cada uma das classes de EAA	27
Figura 3. Mecanismos de ação dos EAA conhecidos até o momento.....	29
Figura 4. Mecanismos de controle vasomotor e interações entre fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio modulando o tônus da célula do musculo liso vascular subjacente.....	37
Figura 5. Ações vasculares do estrogênio e da testosterona	45
Figura 6. Cronograma do protocolo utilizado no Estudo 1.....	57
Figura 7. Cronograma do protocolo utilizado no Estudo 2.....	58
Figura 8. Cronograma do protocolo utilizado no Estudo 3.....	60
Figura 9. Fases do ciclo estral detectadas através de esfregaço vaginal em microscópio ótico.....	63
Figura 10. Fotografia da técnica de ovariectomia.....	64
Figura 11. Ilustração do protocolo de treinamento físico (saltos em água).	66
Figura 12. Fotografia da artéria mesentérica superior.....	67
Figura 13. Registro típico representativo da construção da curva dose-resposta a ACh	68
Figura 14. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC na ausência de inibidores farmacológicos	78
Figura 15. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC na presença de AG	81
Figura 16. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC na presença de L-NAME	85
Figura 17. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC na presença de L-NAME + INDO.....	85

Figura 18. Diferença percentual da área abaixo da curva na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO entre os grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC	86
Figura 19. Resultados da intensidade da banda proteica das isoformas endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) da óxido nítrico sintase, proteína quinase B (Akt) e NADPH oxidase (gp91 ^{phox}) nos ramos mesentéricos nos grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC	88
Figura 20. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos SHAM, SHAM+DN e OVX na ausência de inibidores farmacológicos	92
Figura 21. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos SHAM, SHAM+DN e OVX na presença de inibidores farmacológicos.....	92
Figura 22. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos OVEH + SED, ODN + SED, OVEH + EXC e ODN + EXC na ausência de inibidores farmacológicos.....	98
Figura 23. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos OVEH + SED, ODN + SED, OVEH + EXC e ODN + EXC na presença de L-NAME	100
Figura 24. Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos OVEH + SED, ODN + SED, OVEH + EXC e ODN + EXC na presença de L-NAME + INDO	101
Figura 25. Diferença percentual na área abaixo da curva na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO entre os grupos OVEH + SED, ODN + SED, OVEH + EXC e ODN + EXC	103
Figura 26. Resultados da intensidade das bandas proteicas das isoformas endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) do óxido nítrico sintase, proteína quinase B (Akt) e NADPH oxidase (gp91 ^{phox}) nos ramos mesentéricos nos grupos OVEH + SED, ODN + SED, OVEH + EXC e ODN + EXC	104
Figura 27. Representação esquemática dos principais resultados obtidos no presente estudo.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AC	Adenilato Ciclase
ACh	Acetilcolina
AG	Aminoguanidina
Akt	Proteína Quinase B
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
AR	Receptor de Androgênio
ATP	Adenosina Trifosfato
AUC	Área Abaixo da Curva
COX	Ciclo-oxigenase
dAUC	Diferenças de Área Abaixo da Curva
DCV	Doença Cardiovascular
DHT	5 α -di-hidrotestosterona
DN	Decanoato de Nandrolona
EAA	Esteroides Anabólicos Androgênicos
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado de Endotélio
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ER	Receptor de Estrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GC	Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina

HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
HRE	Elementos de Resposta Hormonais
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
LVM	Leito Vascular Mesentérico
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma química reduzida)
nNOS	Oxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
pD ₂	Logaritmo Negativo da EC ₅₀
PGs	Prostanoides
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PKA	Proteína Quinase Dependente de AMPc
PKC	Proteína Quinase C
PKG	Proteínas Quinases Dependentes de GMPc
PR	Receptor de Progesterona
RBJ	Reflexo Bezold-Jarisch
R _{máx}	Resposta Máxima
SCV	Sistema Cardiovascular

RESUMO

Decanoato de nandrolona (DN) é um esteroide anabólico androgênico (EAA) que sob regime abusivo pode levar a múltiplos efeitos colaterais adversos. Estudos que apontam alterações cardiovasculares (CV) induzidas por EAA foram principalmente conduzidos em indivíduos do sexo masculino, muito embora mulheres também sejam susceptíveis aos efeitos colaterais dos EAAs e diferenças sexo-específicas na predisposição a doenças vasculares existam. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações de reatividade vascular induzidas pelo tratamento crônico com DN tanto em ratas sedentárias como em fêmeas treinadas, bem como a participação dos fatores de relaxamento endotelial sobre a resposta vascular. Foram utilizadas ratas Wistar adultas (180-200 g), sedentárias ou submetidas a treinamento físico, intactas ou ovariectomizadas, tratadas com DN (20 mg/Kg/semana) durante 4 semanas. Ao final do protocolo experimental, foram realizadas curvas dose-resposta à acetilcolina (ACh) em leitos vasculares mesentéricos (LVM) isolados na ausência e presença de inibidores farmacológicos para avaliação da reatividade vascular. Nossos principais achados mostram que o tratamento com DN alterou a função endotelial no LVM tanto em fêmeas sedentárias quanto em fêmeas submetidas ao treinamento físico. Alterações na via do óxido nítrico (NO) parecem ser o principal mecanismo responsável pelo prejuízo na reatividade vascular, como observado nas curvas dose-resposta à ACh em presença de L-NAME (inibidor da NO sintase (NOS)) e aminoguanidina (inibidor seletivo da NOS induzível), bem como por meio da diminuição da fosforilação de eNOS (Ser¹¹⁷⁷) e Akt (Ser⁴⁷³) e aumento da expressão proteica de iNOS e NADPH oxidase. Tanto o componente de relaxamento EDHF quanto os prostanoídeos parecem não estar alterados nos LVMs provenientes de fêmeas tratadas com DN, uma vez que em presença de L-NAME e Indometacina (inibidor da ciclooxigenase) a resposta vasodilatadora à ACh permaneceu inalterada entre os grupos estudados. O treinamento físico por levantamento de peso em água não reverteu as alterações vasculares induzidas pelo tratamento com DN. O tratamento com o EAA também reduziu significativamente os níveis séricos de estradiol nas fêmeas intactas, de modo que as modificações funcionais nos LVMs destas fêmeas foram semelhantes às observadas em fêmeas ovariectomizadas não-tratadas com DN. Estes resultados fornecem novos dados que ajudam a elucidar o papel modulador dos EAAs sobre a função endotelial em fêmeas e levantam a possibilidade de que o tratamento com DN aumente o risco de lesão vascular no sexo feminino, condição que poderia predispor ao surgimento de doenças CV.

Palavras-chave: Decanoato de nandrolona; Esteroides anabólicos androgênicos; Reatividade vascular; Óxido nítrico; Treinamento físico

ABSTRACT

Nandrolone Decanoate (ND) is an Anabolic Androgenic Steroid (AAS) that under abusive regimen can lead to multiple physiological adverse effects. Studies of AAS-mediated cardiovascular (CV) alterations were mostly taken from male subjects, even though women are also susceptible to the effects of AAS and sex-specific differences in susceptibility to vascular diseases exist. The aim of this study was to investigate ND-induced vascular reactivity alterations in both sedentary and exercised female rats as well as the participation of endothelium-derived factors on the vascular response. Adult Wistar female rats (180-200g), sedentary or exercise trained, intact or ovariectomized, treated with ND (20 mg/kg/week) for 4 weeks were used. At the end of the experimental protocol, dose-response curves to acetylcholine (ACh) were performed in isolated mesenteric vascular beds (MVBs) in the absence and presence of pharmacological inhibitors to assess the vascular reactivity. Our main findings show that chronic exposure of female rats to ND impaired the endothelial function in MVBs from both sedentary and trained animals. The nitric oxide (NO) pathway appear to be the main responsible mechanism involved in the impairment of the vascular reactivity, as observed in the ACh-induced vasodilation in presence of L-NAME (NO synthase inhibitor (NOS)) and aminoguanidine (selective inhibitor of inducible NOS), as well as by the decreasing of the phosphorylation sites of eNOS (Ser¹¹⁷⁷) and Akt (Ser⁴⁷³) and upregulation of iNOS and NADPH oxidase expression. Neither the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) component nor prostanoids were altered in the MVBs from ND-treated females, since in the presence of L-NAME and Indomethacin (cyclooxygenase inhibitor) the vasodilator response to ACh remained unchanged amongst the studied groups. Exercise training by weight lifting in water did not improve the vascular alterations induced by ND treatment. ND treatment also significantly reduced the serum levels of estradiol in intact females, so that functional changes in the MVBs of these females were similar to those found in ovariectomized animals not treated with AAS. These results provide new data that help uncover the role of AAS modulating endothelial function in females and raise the possibility that ND treatment may increase the risk of female vascular injury, a condition that could predispose to CV disease.

Keywords: Nandrolone Decanoate; Anabolic Androgenic Steroids; Vascular Reactivity; Nitric Oxide; Exercise Training

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAA)

Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona originalmente desenvolvidos para fins terapêuticos de modo a proporcionar maior potência anabólica (síntese proteica e crescimento muscular) com mínimo efeito androgênico (masculinizante) (KOPERA, 1985; LUKAS, 1996). Embora empregados clinicamente para o tratamento de doenças crônicas (e.g. hipogonadismo, distúrbios endócrinos, caquexia e perda de massa muscular) (BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001), o uso predominante dos EAA é a autoadministração ilícita a fim de melhorar o desempenho atlético ou a imagem corporal (KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008, 2010). Contudo, ao serem usados sem orientação médica e/ou em doses supra terapêuticas, os EAA podem causar problemas hepáticos, endócrinos, cardiovasculares, comportamentais e reprodutores (HARTGENS; KUIPERS, 2004; KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008, 2010; NIESCHLAG; VORONA, 2015).

O uso abusivo dos EAA com propósitos não-terapêuticos se restringia principalmente a atletas de elite do sexo masculino até a metade do século XX (KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008). Entretanto, no decorrer dos anos, este perfil de usuários se alterou estimulado pela ubiquidade da informação sobre os EAA através da internet e outros meios de comunicação bem como a uma infinidade crescente de drogas desta classe com *design* sofisticado (LABRIE et al., 2005; ONAKOMAIYA; HENDERSON, 2016). Atualmente, os usuários ilícitos dos EAA incluem homens e mulheres, jovens

e adultos, atletas e não-atletas (ELLIOT et al., 2007; JOHNSTON et al., 2013; POPE et al., 2014; IP et al., 2015).

Estudos epidemiológicos apontam que a prevalência global de uso ilícito de EAA é de 6,4 % para homens e 1,6 % para mulheres (SAGOE et al., 2014). Nos Estados Unidos, um estudo de estimativa de prevalência de uso de EAA na população geral indicou que dentre americanos entre idades de 13 a 50 anos, 2,9 a 4,0 milhões já utilizaram esteroides anabólicos (POPE et al., 2014). Tais números são ainda maiores em adolescentes: em 2013, o percentual de estudantes americanos que fizeram uso de EAA ao menos uma vez foi de 1,1 % na 8ª série, 1,3 % na 10ª série, e 2,1 % na 12ª série (JOHNSTON et al., 2013). Outra recente pesquisa envolvendo 2793 adolescentes americanos indicou que 5,9 % dos entrevistados do sexo masculino e 4,6 % do sexo feminino utilizaram esteroides com objetivo de ganho muscular e/ou melhoramento estético (EISENBERG; WALL; NEUMARK-SZTAINER, 2012). Tais taxas são semelhantes às taxas de abuso de EAA relatados em outros países ocidentais (SAGOE et al., 2014).

No Brasil, uma revisão sistemática realizada por Abrahin e cols. (2014) mostrou que a prevalência do uso de EAA varia entre 2,1 % e 31,6 %, de acordo com a região analisada e as características da amostra. Um recente levantamento realizado no estado da Paraíba mostrou que 20,1 % de frequentadores de academia são usuários de EAA (DE SIQUEIRA NOGUEIRA et al., 2014). Outro estudo realizado entre estudantes da área da saúde da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus, estimou uma frequência de 2,1 % para o abuso de EAA durante a vida (LUCAS et al., 2006). Resultados similares foram encontrados por Canuto e cols. (2006), os quais estimaram ser de 2,7 % a frequência entre calouros da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia. Torna-se evidente, desta forma, que o uso abusivo de EAA é um

problema de saúde pública não somente no Brasil, mas também em diversos outros países.

1.1.1 Histórico do Desenvolvimento e Uso dos EAAs

O termo *androgênico* tem origem grega (andro = homem e gennan = produzir) e sua definição é “qualquer substância caracterizada por sua capacidade de estimular o desenvolvimento dos característicos sexuais no homem” (MICHAELIS, 2016). Na antiguidade, os órgãos sexuais de animais e suas secreções eram empregados para tratamentos de disfunção erétil e também como instrumentos afrodisíacos. No início do século XIX o pesquisador alemão Arnold Adolf Berthold (1803–1861) observou que a castração de galos resultava em alterações no comportamento sexual e aparência física dos animais, efeitos que eram revertidos após a reimplantação do tecido testicular na cavidade abdominal. Estes experimentos iniciais levaram à conclusão de que os testículos continham uma substância que era transportada na corrente sanguínea. Aproximadamente meio século após a descoberta de Berthold, Ernest Starling (1866–1927) nomeou tais “substâncias produzidas recorrentemente para atender necessidades fisiológicas do organismo e carregadas do órgão em que são produzidos para o órgão de destino pela corrente sanguínea” como *hormônios* (do grego *ormóni* = evocar ou excitar) (HENDERSON, 2005; TATA, 2005).

No final do século XIX (1889) o fisiologista francês Charles Eduard Brown-Séquard experimentou uma terapia de rejuvenescimento em si próprio, aplicando injeções intravenosas de um produto líquido derivado de testículos de cães e porcos, obtendo como resultado o aumento da sua energia intelectual e força física. Após a descoberta de Brown-Séquard, diversos grupos iniciaram a busca pelo “hormônio masculino”,

resultando no isolamento da testosterona em sua forma cristalina em 1935 (DAVID et al., 1935; HOBBERMAN; YESALIS, 1995). Por terem mapeado a estrutura da testosterona, Butenandt e Ruzicka foram nomeados ganhadores do prêmio Nobel de química no ano de 1939 (BUTENANDT; HANISCH, 1935; RUZICKA; WETTSTEIN, 1935). Durante os anos seguintes, pesquisadores dedicaram-se a modificar a estrutura da testosterona a fim de desenvolver derivados sintéticos com maior efeito anabólico, criando a família de hormônios que hoje chamamos de EAA (KOPERA, 1985). Na década de 1940, cientistas confirmaram a afirmação de Brown-Séquard de que andrógenos, principalmente testosterona, poderiam facilitar o crescimento muscular (HOBBERMAN; YESALIS, 1995; FREEMAN; BLOOM; MCGUIRE, 2001). Ao final dos anos 1930 e início dos anos 1940, testosterona e seus derivados foram amplamente prescritos para tratamento de depressão em pacientes psiquiátricos e foram saudados como uma possível cura para o "climatério masculino" (GUIRDHAM, 1940; DANZIGER et al., 1944; ALTSCHULE; TILLOTSON, 1948). Entretanto, ao final da década de 1950, o advento de terapias mais eficazes (e.g. antidepressivos tricíclicos, terapia eletroconvulsiva) fez com que o uso de EAA na prática psiquiátrica reduzisse drasticamente (KANAYAMA et al., 2007). Clinicamente a testosterona e seus derivados são empregados para o tratamento de hipogonadismo, perda de massa muscular e fadiga em pacientes com câncer e HIV, tratamento de disfunções de crescimento e caquexia decorrente de falência renal crônica (BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001; SHAHIDI, 2001).

O desvio do uso de EAA de suas finalidades clínicas possivelmente ocorreu com a publicação do livro “o hormônio masculino” por Paul de Kruif em 1945 que fazia referências ao aumento da libido e do desempenho físico com o uso da testosterona. Assim, atletas começaram a experimentar preparações contendo testosterona com o

objetivo de aumentar massa muscular e intensificar protocolos de treinamento. Aparentemente, os EAA foram usados pela primeira vez por russos em campeonato de levantamento de peso em Viena em 1954 (WADE, 1972) e rapidamente seu uso se espalhou em competições de fisiculturismo, atletismo e outros esportes nos quais o desempenho dependiam de força muscular ou velocidade de recuperação durante o treinamento (KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008). Ainda assim, ao longo dos anos 1960 e mesmo em 1970, o uso de EAA foi confinado em grande parte a atletas de elite (YESALIS; BAHRKE, 2000; HARTGENS; KUIPERS, 2004). Impulsionado pelo aumento de publicações de revistas fitness e de musculação, o fisiculturismo competitivo ganhou popularidade ao final da década de 1970. Guias e manuais com informações detalhadas sobre aquisição, autoadministração, doses recomendadas e possíveis efeitos colaterais dos EAA começaram a surgir (DUCHAINE, 1981, 1983, 1989), fazendo com que um número crescente de jovens se tornassem cientes do ganho muscular dramático em curto período que poderiam obter com o uso de EAA. Ao longo da década de 1980, a importância dada à aparência corporal cresceu drasticamente, estimulada pela mídia que veiculava a imagem de homens e mulheres magros, musculosos e esculturais como representação de corpo “ideal” (POPE et al., 1999, 2001). Dessa forma, o uso de EAA começou a se deslocar do domínio do atletismo de elite para a comunidade em geral. Ao final dos anos 1980 e início dos anos 1990, estudos epidemiológicos começaram a documentar aumentos substanciais no consumo de EAA por adolescentes e jovens adultos em diversos países (BUCKLEY et al., 1988; WILLIAMSON, 1993; YESALIS et al., 1993; JOHNSTON et al., 2013), fazendo com que entidades públicas restringissem ou proibissem o uso de EAA devido aos efeitos colaterais decorrentes do abuso destas drogas (DOTSON; BROWN, 2007; KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008) (figura 1).

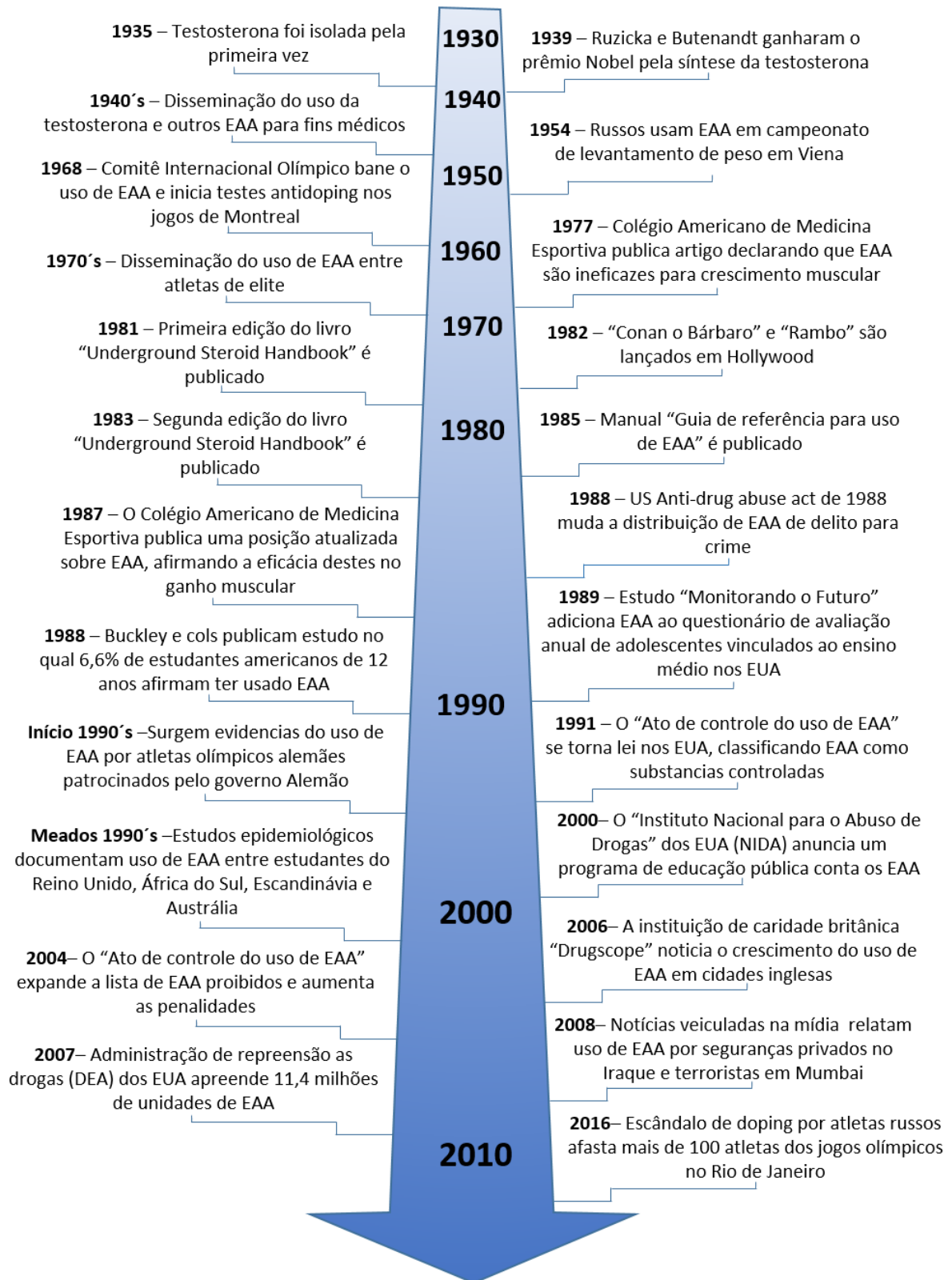


Figura 1. Pontos temporais na evolução do uso ilícito de EAA. Adaptado de Kanayama e cols. (2008).

1.1.2 Classificação e Mecanismo de Ação dos EAA

Apesar da diversidade, todos os EAA são derivados sintéticos da testosterona e possuem uma estrutura básica com 19 átomos de carbono dispostos em quatro anéis fundidos entre si, podendo ser agrupados em três classes (figura 2) (CLARK; HENDERSON, 2003). A primeira classe de EAA, usada principalmente como compostos injetáveis, são derivados da esterificação do grupo 17- β hidroxila da testosterona e são representados pelos EAA propionato e cipionato de testosterona. A esterificação retarda a degradação e prolonga a duração da ação após a injeção do hormônio, diminuindo o seu lançamento na corrente sanguínea (SHAHIDI, 2001). Ésteres de testosterona podem ser hidrolisados em testosterona livre, reduzidos a 5 α -di-hidrotestosterona (DHT), um andrógeno com maior atividade biológica no receptor androgênico (AR) do que a testosterona, ou aromatizados à estrogênio (MARTINI, 1982; WINTERS, 1990).

A segunda classe, denominada derivados da 19-nor-testosterona, também é composta de ésteres de andrógenos injetáveis e inclui, entre outros, o EAA decanoato de nandrolona (DN). Estes compostos possuem em conjunto com a adição de porções de cadeias laterais longas uma substituição de um hidrogênio por um grupo metila na posição C19, fazendo com que sua meia-vida seja ainda maior que os compostos da classe I (SHAHIDI, 2001). EAA desta segunda classe possuem reduzida atividade androgênica quando comparados a DHT, mas também podem ser aromatizados em 17 β -estradiol (RYAN, 1959; WINTERS, 1990).

A terceira classe de EAA engloba compostos alquilados no carbono C17, tais como 17 α -metiltestosterona e estanozolol. Devido ao fato de a alquilação retardar o metabolismo pelo fígado, este grupo de hormônios é ativo por via oral (BASARIA;

WAHLSTROM; DOBS, 2001). Nenhum dos esteroides 17 α -alquilados é convertido em di-hidro compostos ou aromatizados a 17 β -estradiol, embora possam ser convertidos em outros metabólitos androgênicos e estrogênicos (WINTERS, 1990; DE GOOYER et al., 2003).

Dentre os EAA existentes, o derivado da 19-nor-testosterona, DN, é um dos EAA mais utilizados e estudados no mundo (KICMAN, 2008). Sintetizado em meados da década de 50 (FRAGKAKI et al., 2009), DN é o produto da esterificação do EAA nandrolona com o ácido decanóico, o que confere a droga a capacidade de aplicação intramuscular e formação de depósito, mantendo a concentração em estado estável por 6-7 dias após a administração (SHAHIDI, 2001). A remoção do radical metil da posição 19 da molécula de testosterona confere maior resistência à metabolização e à aromatização e aumenta a afinidade do DN pelos receptores androgênicos, consequentemente aumentando os efeitos anabólicos desta droga (FRAGKAKI et al., 2009). No entanto, de forma contrária ao que ocorre com a testosterona, a 5 α -redução da nandrolona diminui a afinidade da molécula pelo AR. Desse modo, em tecidos com baixa atividade da 5 α -redutase (e.g. tecido muscular), o DN proporciona um potente efeito anabólico, ao passo que tecidos com alta atividade da enzima de metabolização (e.g. próstata) possuem um efeito anabólico negligente. Tal característica faz com que o DN apresente uma dissociação favorável dos efeitos miotróficos dos androgênicos, bem como há uma maior relação anabólica:androgênica deste EAA (10) quando comparada a testosterona (1) (KICMAN, 2008).

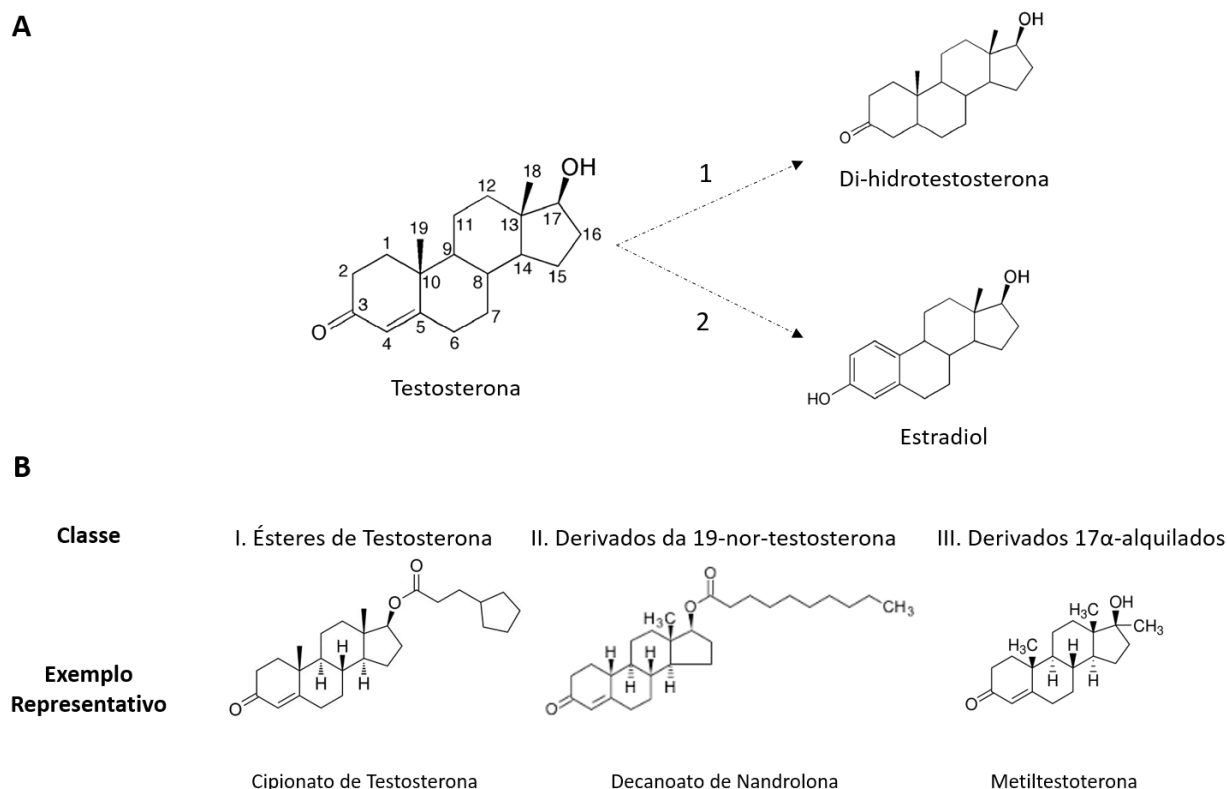


Figura 2. Estruturas químicas (A) da testosterona e seus metabolitos di-hidrotestosterona (DHT) e estradiol gerados pela ação das enzimas (1) 5 α -redutase e (2) aromatase e (B) dos exemplos representativos de cada uma das classes de EAA.

A diversidade das naturezas química e metabólica dos hormônios EAA faz com que estes compostos possuam um complexo mecanismo de ação (figura 3). Com relação a via de sinalização clássica dos hormônios esteroides (detalhes em Aranda & Pascual 2001 e Wierman 2007), todos os EAA são ativos no AR e, portanto, possuem propriedades androgênica e anabólica (SAARTOK; DAHLBERG; GUSTAFSSON, 1984; FRAGKAKI et al., 2009). Entretanto, o grau de interação entre os EAA com o AR nos tecidos-alvo é variável, fazendo com que diferenças entre as atividades anabólica/androgênica existam entre diferentes compostos. Além das ações mediadas via AR, os EAA também podem exercer suas ações biológicas via receptores estrogênicos (ER α , ER β e GPER) diretamente (ATTARDI et al., 2010) ou

após aromatização (KICMAN, 2008), bem como através do receptor de progesterona (PR) (ATTARDI; HILD; REEL, 2006).

O mecanismo de ação dos EAA engloba os efeitos genômico e a não-genômico. De acordo com o modelo clássico de ação genômica, o esteroide entra na célula – por difusão passiva através da membrana lipídica ou assistido por proteínas transportadoras - e se liga aos receptores de esteroides "sexuais" (AR, ER ou PR) que estão localizados no citoplasma. A ligação hormônio-receptor induz uma alteração conformacional no receptor que é acompanhado pela dissociação de proteínas acessórias, expondo, assim, o domínio de ligação ao DNA. O complexo hormônio-receptor se dirige ao núcleo, onde se liga ao DNA e modula a transcrição de genes através de interações com elementos de resposta hormonais (HRE) (LOSEL; WEHLING, 2003; WIERMAN, 2007).

O mecanismo de ação não-genômica é definido por qualquer ação mediada pela ligação hormônio-receptor que não influencia a expressão de genes diretamente, mas impulsiona efeitos mais rápidos, tais como a ativação de cascatas de sinalização. Os hormônios esteroidais ao se ligarem a receptores acoplados às proteínas G induzem uma resposta mediada por canais iônicos (e.g. resultando em aumento do $[Ca^{++}]$ intracelular) e/ou segundos mensageiros (e.g. resultando em ativação de proteínas quinases como PKA e PKC). Estes mensageiros intracelulares atuam diretamente em proteínas efetoras, desencadeando respostas intracelulares e/ou indiretamente promovendo ação genômica. A estimulação da proteína Gs (estimulatória), por exemplo, ativa a adenilato ciclase (AC), catalisando a formação de AMP cíclico (AMPc), o que culmina na ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA, por sua vez, fosforila o elemento de resposta do AMPc (CREB), que atua como fator de transcrição (FALKENSTEIN et al., 2000; LOSEL; WEHLING, 2003).

Além da via clássica, os EAA podem mediar efeitos rápidos por meio de interações com sítios de ligação microssomal (LUZARDO et al., 2000), por meio da regulação alostérica de enzimas envolvidas na biotransformação de esteroides (MOR et al., 2001; PENATTI; PORTER; HENDERSON, 2009), e/ou pela modulação alostérica de canais iônicos (OBERLANDER et al., 2012)

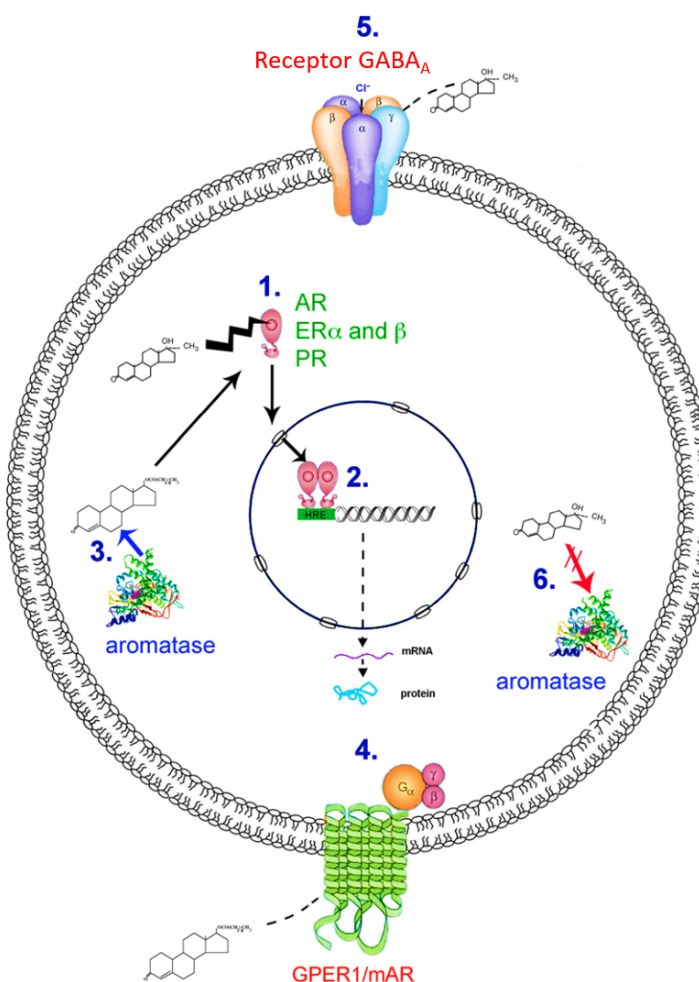


Figura 3. Mecanismos de ação dos EAA conhecidos até o momento. Todos os EAA são os andrógenos e têm ação direta através da (1) ligação a receptores nucleares de androgênio (AR), bem como de estrogênio α e β (ER α ; ER β) e de progesterona (PR), promovendo a dimerização e translocação do receptor para o núcleo, e (2) regulando a expressão gênica através de interações com elementos de resposta hormonal (HRE). Alguns EAA (tais como decanoato de nandrolona) também podem ser (3) aromatizados a estrogênios ou exercer suas atividades através de (4) mecanismos não-genômicos (incluindo ações putativas em receptores metabotrópicos acoplados à proteína G ligados a vias de sinalização segundos mensageiros). Alternativamente, EAA podem modular alostericamente o (5) *gating* de receptores (e.g. GABA_A), e a (6) inibição da aromatase (e.g. metilttestosterona). GPER1: receptor de estrogênio acoplado a proteína G; mAR: Receptor androgênico de membrana. Adaptado de Onakomaiya & Henderson (2016).

1.1.3 Efeitos Adversos do abuso dos EAA

Quando utilizados na prática clínica, seguidos por orientação médica, a administração dos EAA possui benefício terapêutico e são razoavelmente seguros (KICMAN, 2008). Em contrapartida, para os fins de melhora do desempenho esportivo ou para fins cosméticos os usuários de EAA tomam decisões subjetivas sobre doses e tempo de uso de tais medicamentos (e.g. combinação de diferentes EAA em doses extremamente altas; duração da administração que variam de meses a muitos anos), resultando em um rol de riscos à saúde humana (NIESCHLAG; VORONA, 2015). Embora a maioria dos efeitos adversos sejam reversíveis após a interrupção do uso dos esteroides, muitos danos permanentes em diversos órgãos e sistemas são relatados em investigações retrospectivas, estudos de caso e de pesquisa básica em animais (EVANS, 2004; URHAUSEN; ALBERS; KINDERMANN, 2004; NIESCHLAG; VORONA, 2015).

Dados obtidos de estudos observacionais indicam que a maioria (88%-96%) dos usuários ilícitos de EAA experienciam pelo menos um efeito adverso leve, incluindo acne, atrofia testicular, ginecomastia, estrias cutâneas e alterações no metabolismo lipídico (CUNHA et al., 2004; EVANS, 2004). Relacionado ao aspecto reprodutivo, o uso dos EAA exerce um efeito inibitório sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (devido à retroalimentação negativa causada pelas elevadas concentrações de andrógenos exógenos), resultando na supressão da secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). No homem, a diminuição desses hormônios leva a uma queda na produção e secreção de testosterona e, conseqüentemente, casos de hipogonadotrofismo, disfunção sexual, atrofia testicular, redução na espermatogênese e produção de espermatozoides (BAHRKE; YESALIS, 2004; NIESCHLAG; VORONA, 2015). Na mulher, virilização (aumento de pelos faciais,

engrossamento de voz, hipertrofia do clitóris), menarca tardia, dismenorreia, amenorreia, anovulação e, como sua consequência, infertilidade são as alterações mais frequentemente atribuídas ao uso abusivo de EAA (FRANKE; BERENDONK, 1997; NIESCHLAG; VORONA, 2015). No sistema musculoesquelético, o abuso de EAA pode levar à maior ocorrência de lesões músculo-tendinosas, por aumentar a rigidez dos tendões em consequência de alterações na estrutura do colágeno. Se consumido por adolescentes em idade pré-púbere, pode induzir o fechamento epifisário precoce, levando à baixa estatura permanente (EVANS, 2004; DOTSON; BROWN, 2007; FRAGKAKI et al., 2009). No fígado, os EAA podem causar hepatotoxicidade, icterícia, colestase e neoplasias. Além disso, o aumento de diversas enzimas hepáticas (e.g. aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, bilirrubina, desidrogenase láctica, fosfatase alcalina) foi relatado após o uso de esteroides, especialmente derivados 17 α -alquilados (BAHRKE; YESALIS, 2004; FRAGKAKI et al., 2009).

Apesar da ampla lista de alterações fisiológicas causadas pelo uso EAA em doses supra terapêuticas, os efeitos adversos mais reconhecidos são os relacionados ao sistema cardiovascular (SCV) e alterações comportamentais. Agressividade, ansiedade, depressão, impulsividade, além de síndromes afetivas e psicóticas são as manifestações comportamentais mais comumente reportadas na literatura após o uso de EAA (HALL; HALL; CHAPMAN, 2005; TRENTON; CURRIER, 2005; IP et al., 2015). Por exemplo, homens adultos relatam euforia transitória e hipomania no início do curso de administração de EAA (THIBLIN; PETERSSON, 2005), mas usuários de longo prazo podem manifestar aumento da ansiedade e irritabilidade acentuada (HALL; HALL; CHAPMAN, 2005; PAGONIS et al., 2006). Homens que administram altas doses de EAA apresentam pontuações elevadas no SCL-90-R (questionário de

90 sintomas), um sistema de auto relatório que inclui diferentes dimensões de ansiedade e no questionário de agressão de Buss e Perry, o qual avalia diferentes níveis de agressividade (agressão física, verbal, raiva e hostilidade) (POPE; KOURI; HUDSON, 2000). Apesar de estudos clínicos randomizados serem restritos e escassos devido a razões éticas, os poucos que foram realizados também mostraram aumento dos níveis de hostilidade e ansiedade dos participantes que receberam EAA (SU et al., 1993; POPE; KOURI; HUDSON, 2000; PAGONIS et al., 2006). Estudos em animais de laboratório reproduzem e confirmam as alterações comportamentais observadas em humanos, indicando agressividade e comportamentos tipo ansiedade e depressão em testes validados para tal finalidade (AGIS-BALBOA et al., 2009; AMBAR; CHIAVEGATTO, 2009; RICCI; TR; MELLONI JR, 2013; RAINER et al., 2014; ZOTTI et al., 2014).

Evidências sugerem que a sinalização mediada por neurotransmissores clássicos e peptídeos neuromoduladores em circuitos neurais responsáveis pela expressão de agressão e ansiedade são significativamente alterados direta ou indiretamente por EAA. Por exemplo, a produção de serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, dopamina, fator liberador de corticotrofina, neuropeptídeo Y, nociceptina, fator neurotrófico derivado do cérebro e/ou a expressão de seus receptores podem ser modificados após uso de EAA (GRIMES; MELLONI, 2002; AMBAR; CHIAVEGATTO, 2009; OBERLANDER; HENDERSON, 2012a, 2012b; ZOTTI et al., 2014).

Os efeitos negativos do abuso de EAA no SCV são muitos, tais como hipertrofia ventricular, hipertensão arterial, disfunção diastólica, dislipidemia, arteriosclerose, trombose, vasoespasma, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, cardiomiopatia, arritmias ventriculares e morte súbita (AHLGRIM; GUGLIN, 2009;

ACHAR; ROSTAMIAN; NARAYAN, 2010; MONTISCI et al., 2012; MAIOR et al., 2013; SEVERO et al., 2013). Baggish e cols. (2010) e outros autores (DI BELLO et al., 1999; HASSAN; SALEM; SAYED, 2009) mostraram por meio de estudos ecocardiográficos em humanos que doses supra terapêuticas de EAA podem levar tanto a alterações morfológicas quanto a funcionais do coração. Tais alterações incluem hipertrofia miocárdica, possíveis aumentos dos diâmetros das câmaras cardíacas, alterações de função diastólica e relaxamento ventricular, e muito provavelmente um comprometimento da função contrátil ventricular esquerda. Dados obtidos de estudos em animais indicam que a insuficiência cardíaca, bem como outras alterações no coração podem estar relacionados ao surgimento de fibrose, deposição de colágeno intersticial, hipertrofia e apoptose de cardiomiócitos (FRANQUNI et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015), aumento da atividade do sistema renina-angiotensina (ROCHA et al., 2007; UGGERE DE ANDRADE et al., 2011), aumento do tônus autonômico simpático (HASSAN; KAMAL, 2013) e da expressão de receptores β -adrenérgicos (DAS NEVES et al., 2013) e remodelamento elétrico do tecido cardíaco (MEDEI et al., 2010).

Outrossim, usuários de EAA apresentam um estado pró-trombótico aumentado, principalmente devido a uma maior ativação da agregação plaquetária (AJAYI; MATHUR; HALUSHKA, 1995). Wu & Von Eckardstein (2003) mostraram que dosagens elevadas de EAA induzem aumento da expressão de moléculas de adesão nas paredes dos vasos, facilitando a ligação das plaquetas ao endotélio, mecanismo que contribui para o surgimento de aterosclerose. Alterações no metabolismo lipídico também se somam aos fatores que contribuem para a formação do processo aterogênico mediado pelo uso de EAA, com destaque para aumento dos níveis de LDL e redução de HDL (MELCHERT; WELDER, 1995; HARTGENS; KUIPERS, 2004;

LANE et al., 2006). Ademais, tais alterações no perfil lipídico também estão implicadas com o surgimento de doença arterial coronariana e danos na parede vascular arterial, pois facilitam a iniciação de processo inflamatório (e.g. aumento do recrutamento de macrófagos, aumento de citocinas inflamatórias) (WU; VON ECKARDSTEIN, 2003; FRANQUINI et al., 2013; SEVERO et al., 2013; RIEZZO et al., 2014).

Além das citadas anteriormente, somam-se a lista de alterações mediadas pelo uso de EAA e que facilitam o surgimento de doença cardiovascular (DCV) a disfunção do endotélio e da reatividade vascular (FERRER et al., 1994; LANE et al., 2006; SUN et al., 2013), bem como a dessensibilização de reflexos cardiovasculares (e.g. barorreflexo e cardiopulmonar), como demonstrado por nosso grupo de pesquisa e por outros (BEUTEL; BERGAMASCHI; CAMPOS, 2005). Bissoli e cols. (2009) observaram pela primeira vez que o uso de altas doses de DN cronicamente (8 semanas) promove redução na sensibilidade do Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ), o que foi posteriormente confirmado por Uggere de Andrade e cols. (2011) e por outros estudos usando dose maior, porém com menor tempo de exposição, 4 semanas (FRANQUINI et al., 2013; LIMA et al., 2015).

Inúmeras são as evidências de que os EAA acarretam um grande prejuízo para a saúde de ordem fisiológica, bioquímica e comportamental. Todavia, vale ressaltar que as implicações patológicas causadas pelos esteroides estão diretamente relacionadas ao tipo de estrutura, dose e tempo de uso de tais drogas, bem como a idade e sexo do usuário, como amplamente discutido em diversas revisões de literatura (CLARK et al., 2006; VANBERG; ATAR, 2010; OBERLANDER; HENDERSON, 2012a; ONAKOMAIYA; HENDERSON, 2016).

1.2 TÔNUS VASCULAR, FUNÇÃO ENDOTELIAL E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

1.2.1 Mecanismos Fisiológicos da Regulação Vascular

Os vasos sanguíneos fornecem a principal ligação entre o coração e os tecidos, e sua saúde e função são, portanto, fundamentais para homeostasia do SCV. Em condições basais, a maioria dos vasos de resistência e capacitância exibem algum grau de contração do músculo liso que determina o diâmetro do vaso. Este grau de contração sustentada do sistema vascular chama-se tônus vascular, o qual regula a resistência vascular periférica e, por conseguinte, o fluxo sanguíneo tecidual regional e a pressão sanguínea sistêmica exercendo (FRIES; FRIES; WESOLOWSKI, 1963; ORSHAL; KHALIL, 2004).

A regulação do tônus vascular é realizada por mecanismos de controle centrais (extrínsecos) e influências locais que são intrínsecas aos tecidos e ativam a contração ou relaxamento das células do músculo liso vascular. Os processos de controle central que têm impacto sobre o fluxo sanguíneo incluem aferências nervosas e humorais (e.g. neurotransmissores liberados pelas terminações nervosas e hormônios circulantes, respectivamente) enquanto os mecanismos reguladores locais incluem fatores metabólicos, mecânicos, endoteliais e parácrinos (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; JACKSON, 2000; ALDHAHI; HAMDY, 2003; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; KAWASAKI et al., 2011). Dentre estes, o endotélio possui papel de destaque na manutenção da homeostase vascular, devido ao fato de (1) se integrar anatomicamente a vasculatura (endotélio é uma camada única de tecido pavimentoso localizado entre o sangue o músculo liso vascular), (2) criar uma interface entre os

mecanismos de regulação neuronais e humorais e (3) secretar fatores vasoativos que contribuem para a promoção de um ambiente protetor contra o desenvolvimento de aterosclerose (SANDOO et al., 2010; WIDMER; LERMAN, 2014).

Além da sua participação no controle da resistência vascular, o endotélio também desempenha um papel dinâmico em processos inflamatórios, crescimento vascular, migração celular, formação de e interação com moléculas da matriz extracelular, metabolismo lipídico e regulação da permeabilidade capilar (DANIEL; IVES, 1989; VANHOUTTE; FELETOUM; TADDEIM, 2005). De fato, é bem estabelecido que o endotélio apresenta a capacidade de detectar um grande número de substâncias químicas na corrente sanguínea e no tecido intersticial, bem como alterações mecânicas decorrentes da distensão secundária a alterações na pressão transmural do vaso e na força de cisalhamento. Em resposta a estes estímulos químicos e mecânicos, as células endoteliais secretam substâncias e/ou geram sinais elétricos que modulam as respostas contráteis do músculo liso subjacente (KORTHUIS, 2011; RAJENDRAN et al., 2013). A figura 4 exemplifica alguns mecanismos de controle vasomotor e as interações entre fatores relaxantes e contráteis produzidos pelo endotélio com a célula do músculo liso vascular subjacente.

Dentre os fatores vasoativos secretados pelo endotélio, os principais fatores relaxantes incluem o óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina (PGI_2), enquanto os principais vasoconstritores englobam endotelina, angiotensina II, espécies reativas de oxigênio (EROS), tromboxanos e algumas prostaglandinas (figura 4) (SADER; CELERMAJER, 2002; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; SANDOO et al., 2010).

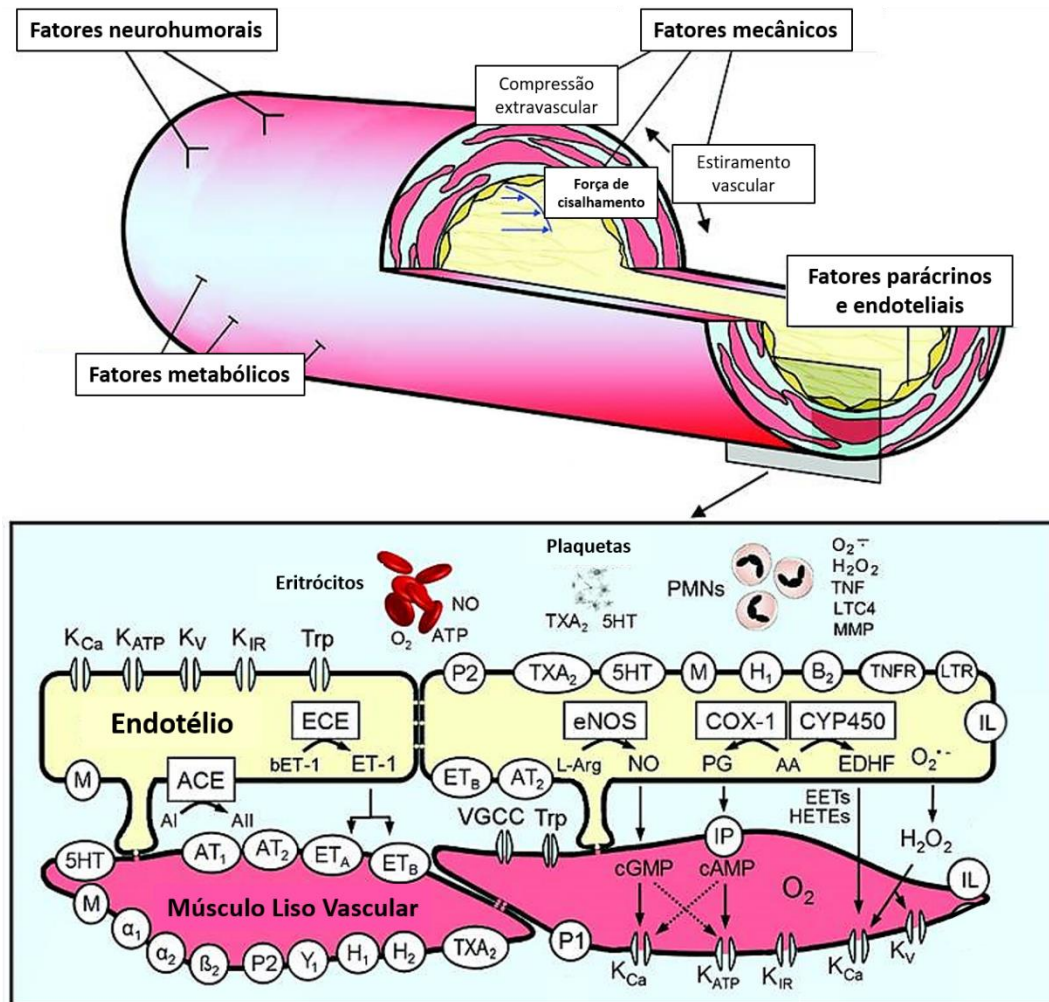


Figura 4. Mecanismos de controle vasomotor (painel superior), e interações entre fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio modulando o tônus da célula do músculo liso vascular subjacente. K_{Ca}: canal de potássio ativado por cálcio; K_{ATP}: canal de potássio ativado por ATP; K_V: canal de potássio voltagem dependente; K_{IR}: canal de potássio retificador de influxo; Trp: receptor de potencial transiente; O₂: oxigênio; ATP: adenosina trifosfato; NO: óxido nítrico; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; L-Arg: L-arginina; TXA₂: tromboxano A2 e seu receptor; 5HT: 5-hidroxitriptamina e seu receptor; PMNs: leucócitos polimorfonucleares; O₂⁻: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; TNF: fator de necrose tumoral e seu receptor (TNFR); LTC₄: leucotrieno C4; LTR: receptor de leucotrieno; MMP: metaloproteinases da matriz; P2: receptor purinérgico tipo 2; M: receptor muscarínico; H₁ e H₂: receptores de histamina; B₂: receptor de bradicinina; ECE: enzima conversora de endotelina; ET-1: endotelina 1; ET_A: receptor de endotelina tipo A; ET_B: receptor de endotelina tipo B; COX-1: ciclo-oxigenase 1; PG: prostaglandinas; AA: ácido araquidônico; IP: receptor de prostaciclina; CYP450: citocromo P450; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio; ACE: enzima conversora de angiotensina; AI: angiotensina I; AII: angiotensina II; AT₁: receptor de angiotensina tipo I; AT₂: receptor de angiotensina tipo II; VGCC: canal de cálcio dependente de voltagem; EETs: ácidos epoxieicosatrienoicos; HETEs: ácidos hidroxieicosatetraenoico; α₁: receptor adrenérgico α₁; α₂: receptor adrenérgico α₂; β₂: receptor adrenérgico β₂; Y₁: receptor do neuropeptídeo Y; P₁: receptor purinérgico tipo 1; IL: receptor de interleucinas; cGMP: Monofosfato Cíclico de Guanosina; cAMP: Adenosina Monofosfato Cíclico. Adaptado de Korthuis (2011).

A participação do endotélio na regulação do tônus do músculo liso vascular foi reconhecida somente em 1980, quando Furchgott e Zawadzki observaram que anéis de aorta de coelhos relaxavam mediante aplicação de acetilcolina apenas na presença de um endotélio intacto (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Este fator liberado pelo endotélio recebeu inicialmente o nome de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), o qual posteriormente foi identificado como NO (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). No decorrer dos últimos anos estudos vem mostrando o papel fundamental do NO na manutenção do tônus arterial de repouso (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; SADER; CELERMAJER, 2002; MULLER; MORAWIETZ, 2009), bem como o de principal agente vasodilatador em vasos de condutância e, mais recentemente, em vasos de resistência (WOODMAN; WONGSAWATKUL; SOBEY, 2000; PANIAGUA; BRYANT; PANZA, 2001; CHATTERJEE; CATRAVAS, 2008; CALIMAN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

O NO é sintetizado pela óxido nítrico sintase (NOS), sendo descritas três isoformas desta enzima: eNOS (endotelial), nNOS (neuronal) e iNOS (induzida) (FÖRSTERMANN et al., 1994). As isoformas eNOS e nNOS são constitutivamente expressas e tem sua ativação dependente do complexo cálcio-calmodulina, enquanto a expressão de iNOS é induzida em células vasculares endoteliais e lisas após exposição a estímulos inflamatórios e são ativadas independente do íon cálcio (NAWATE et al., 2005). Após sua produção, o NO difunde-se rapidamente até as células musculares lisas onde estimula a enzima guanilato ciclase solúvel (GC), consequentemente promovendo um aumento da concentração intracelular de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento dos níveis do segundo mensageiro GMPc ativa proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) as quais promovem relaxamento pela redução de cálcio intracelular ou pela hiperpolarização

da célula muscular via ativação de canais de potássio (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; SANDOO et al., 2010; KORTHUIS, 2011). O NO também pode promover relaxamento atuando de forma independente do PKG através da ativação direta dos canais de potássio ativados por cálcio, promovendo hiperpolarização muscular (BOLOTINA et al., 1994).

Uma grande variedade de substâncias vasoativas, incluindo fatores físicos e químicos, ativam a NOS, estimulando a produção de NO. Dentre estes estão estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento, agregação plaquetária, histamina, catecolaminas, vasopressina, bradicinina, adenosina, serotonina, acetilcolina e noradrenalina (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; KORTHUIS, 2011). Além da ação vasodilatadora, o NO também está envolvido na prevenção da ativação de plaquetas e leucócitos e sua aderência à parede do vaso (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Outras substâncias liberadas pelo endotélio com poder vasomotor são os prostanoídes (PGs). Estes são derivados do ácido araquidônico (AA) e podem promover tanto vasoconstrição como vasodilatação e, por este motivo, estão diretamente relacionados ao controle do tônus e da reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas (CAUGHEY et al., 2001). As células endoteliais expressam ciclo-oxigenase (COX), que converte o AA em prostaglandina H_2 (PGH_2), um substrato para a formação de PGI_2 , considerado o principal prostanóide vasodilatador endotelial. A PGH_2 também pode ser convertida em outros PGs vasoativos, incluindo por exemplo a prostaglandina E_2 (vasodilatadora) e o vasoconstritor tromboxano A_2 (BABER et al., 2005). A PGI_2 induz relaxamento vascular através da sua ligação à receptores específicos acoplados à proteína Gs (estimulatória) nas células do músculo liso que, quando ativados, estimulam a AC e, conseqüentemente, produzem aumento

dos níveis intracelulares de AMPc. O AMPc ativa a PKA que, assim como a PKG, fosforila diversas proteínas, reduzindo o cálcio intracelular e promovendo relaxamento (WRIGHT et al., 2001; BOS et al., 2004). Entretanto, a contribuição da PGI₂ no relaxamento mediado pelo endotélio é relativamente pequena em diversos leitos vasculares.

Em numerosos segmentos vasculares de diferentes espécies, incluindo humanos, foi demonstrado que as respostas de relaxamento vascular dependente do endotélio não são totalmente explicadas pela liberação de NO e PGs (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). Mesmo em presença de inibidores da COX e da NOS ambos estímulos químicos e mecânicos induzem uma resposta de relaxamento residual, propondo-se desta forma que as células endoteliais podiam liberar outro fator que induzia a hiperpolarização da membrana muscular lisa e, assim, causar relaxamento (COHEN; VANHOUTTE, 1995; BRANDES et al., 2000; HOEPFL et al., 2002). Este fator recebeu o nome de EDHF (TAYLOR; WESTON, 1988) e, apesar de sua identidade ainda não ser bem estabelecida, muitas evidências apontam como possíveis candidatos a EDHF produtos derivados do metabolismo do citocromo P450, EROS (como peróxido de hidrogênio ou superóxido), potássio extracelular, ácidos epoxieicosatrienoicos ou mesmo o acoplamento elétrico entre as células endoteliais e musculares lisas através de junções comunicantes (*gap junctions*) (EDWARDS et al., 1998; FISSALTHALER et al., 1999; GRIFFITH; TAYLOR, 1999; MATOBA et al., 2000; SANDOW; HILL, 2000; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; SHIMOKAWA, 2010; JENNINGS et al., 2015). A vasodilatação induzida pelo EDHF ocorre com participação ativa dos canais de potássio presentes nas células do músculo liso vascular. Em geral, as respostas mediadas pelo EDHF envolvem o aumento de Ca⁺² intracelular, que ao ser liberado, induz vasodilatação por meio da abertura dos canais de K⁺ ativados por Ca⁺²

(FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). A contribuição do EDHF no processo de relaxamento vascular é significativamente maior em vasos de resistência que em vasos de grande diâmetro (WOODMAN; WONGSAWATKUL; SOBEY, 2000).

Em condições normais, as respostas de relaxamento dependente do endotélio são geralmente atribuídas à síntese e liberação de NO, PGI₂ e EDHF (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Entretanto, o endotélio modula a vasomoção não somente por ação destas substâncias, mas também por um aumento no tônus constritor através da geração de endotelina, PGs vasoconstrictores, angiotensina II e ânion superóxido (O₂⁻), por exemplo (RAY; SHAH, 2005; VANHOUTTE; FELETOUM; TADDEIM, 2005). Esses agentes vasoconstrictores agem predominantemente em nível local, mas também podem exercer alguns efeitos sistêmicos e têm um papel na regulação da estrutura e remodelamento vascular (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007). A resposta vascular que permite obter um tônus basal fisiológico resulta da interação de todos os fatores, vasoconstrictores e vasodilatadores, e qualquer desequilíbrio na liberação destes resulta numa situação patológica.

A disfunção endotelial representa uma mudança de um fenótipo quiescente para um estado reativo, no qual geralmente há menor produção e/ou disponibilidade de vasodilatadores (principalmente NO) ou aumento da produção de fatores constritores pelas células endoteliais (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005). É considerada um denominador comum de todas as patologias cardiovasculares, tais como hipertensão arterial, hipercolesterolemia, aterosclerose, insuficiência cardíaca, doenças isquêmicas e também está associada aos fatores de risco que predispõem às patologias cardiovasculares, tais como o tabagismo, diabetes e envelhecimento (CAI; HARRISON, 2000; DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; VERSARI et al., 2009; WIDMER; LERMAN, 2014).

1.2.2 Hormônios Sexuais, EAA e Função Vascular

Embora seja reconhecida a diferença na prevalência e severidade de DCVs entre sexos, a existência de diferenças na função vascular entre homens e mulheres somente foi reconhecida nas últimas décadas (HAYWARD; KELLY; COLLINS, 2000). A incidência de DCVs, por exemplo, é maior em homens entre 30-50 anos quando comparados a mulheres de mesma idade (WU; VON ECKARDSTEIN, 2003; WANG et al., 2012). Entretanto, este benefício feminino se suprime com o estabelecimento da menopausa, mostrando o efeito cardioprotetor dos hormônios sexuais femininos (KNOWLTON; LEE, 2012). Adicionalmente, estudos realizados em segmentos arteriais de animais indicam que a reatividade vascular induzida por agentes vasoativos não é diferente entre machos intactos e castrados, ao passo que vasos obtidos de fêmeas ovariectomizadas apresentam menor dilatação e/ou maior contração que o de fêmeas intactas de mesma idade (CREWS; KHALIL, 1999; KANASHIRO; KHALIL, 2001; BARRON; GREEN; KHALIL, 2002), sugerindo que as diferenças sexuais no tônus vascular são provavelmente relacionadas ao estrogênio do que aos andrógenos.

A regulação da função vascular pelos hormônios sexuais é dependente (1) dos níveis circulantes de 17β -estradiol, testosterona e em certo grau, progesterona, (2) da expressão dos receptores destes hormônios em ambas células endoteliais e do músculo liso vascular, e, finalmente (3) da interação hormônio-receptor (GARGETT et al., 2002; SADER; CELERMAJER, 2002; WELTER et al., 2003; ARNAL et al., 2010; TORRES-ESTAY et al., 2015). As ações dos hormônios sexuais sobre o vaso incluem a alteração ou modulação do fluxo de íons e expressão de receptores nas células

musculares lisas bem como a modulação da produção e atividade de fatores derivados do endotélio. O estrogênio exerce efeito vasodilatador direto sobre o músculo liso vascular, inibindo canais de cálcio voltagem dependente do tipo L (RUEHLMANN et al., 1998) ou ainda estimulando o efluxo de potássio (VALVERDE et al., 2000). No endotélio, o estrogênio regula a ativação de enzimas e a transcrição de vários genes de modo a proporcionar efeitos vasodilatadores, inibição da proliferação celular e agregação plaquetária, redução do estresse oxidativo e inflamação (TOSTES et al., 2003; ARNAL et al., 2010; KNOWLTON; LEE, 2012) (figura 5).

Através da interação com seus receptores ($ER\alpha$, $ER\beta$ e GPER), alguns mecanismos pelos quais o estrogênio atua no controle vascular são por meio da estimulação da produção de NO [aumentando a atividade da eNOS, da PI3K, Akt, ERK 1/2, e MAP quinases (envolvidas em vias de sinalização não-genômica)] e de PGI_2 (aumento das atividades da sintase de prostaciclina e da COX) (WAKASUGI et al., 1989; HAYNES et al., 2000; SIMONCINI et al., 2000; ORSHAL; KHALIL, 2004). O estrogênio também promove a redução (1) dos níveis circulantes de endotelina, (2) da atividade da NADPH oxidase (principal enzima produtora de EROS no endotélio), (3) do estresse oxidativo induzido por angiotensina II e (4) da expressão de receptores AT1 na membrana da célula do músculo liso vascular (NICKENIG et al., 2000; WEBB et al., 2000; GRAGASIN et al., 2003; CALIMAN et al., 2013). Outros exemplos não menos importantes são a inibição da expressão de moléculas de adesão na parede vascular induzida pelas citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, bem como a inibição da ativação de fatores de transcrição de mediadores inflamatórios, como o NF κ B (MILLER; DUCKLES, 2008; XING et al., 2009).

Contrariamente aos efeitos benéficos bem caracterizados do estrogênio sobre a regulação vascular, as ações da progesterona e seus derivados são menos evidentes.

Enquanto alguns estudos apontam que este hormônio possa estimular a produção de NO (SELLES et al., 2002; PANG; DONG; THOMAS, 2015), reduzir a expressão de moléculas de adesão leucocitária (SIMONCINI et al., 2004) e restaurar o controle do tônus endotelial em situações de deficiência de estrogênio (CHATAIGNEAU et al., 2004), outros autores mostram inibição do relaxamento ou mesmo uma atenuação dos efeitos benéficos induzidos pelo 17 β -estradiol sobre o tecido vascular quando associado a terapias com progesterona (MILLER; VANHOUTTE, 1991; MERCURO et al., 1999; MIKKOLA; VIINIKKA; YLIKORKALA, 2000).

Com relação a modulação da reatividade vascular pela testosterona, dados da literatura mostram-se controversos. O aumento dos níveis circulantes deste hormônio estão associados a diminuição da função endotelial via redução da biodisponibilidade de NO, PGI₂ e EDHF (NAKAO et al., 1981; GONZALES; KRAUSE; DUCKLES, 2004; PARK et al., 2004), bem como aumento do estresse oxidativo (SKOGASTIERNA et al., 2014), resultando em menor relaxamento dependente do endotélio e aumento da vasoconstrição (FARHAT et al., 1995; AMMAR; SAID; HASSAN, 2004; TOOT et al., 2011). Por outro lado, diversos autores propuseram que a testosterona poderia induzir relaxamento vascular dependente e independentemente do endotélio em artérias coronárias e aorta (YUE et al., 1995; CHOU et al., 1996; CREWS; KHALIL, 1999; ROUVER et al., 2015), possivelmente através do bloqueio de canais de cálcio associados a membrana (JONES et al., 2002) e abertura de canais de potássio (DING; STALLONE, 2001). Não obstante, NO e EDHF também foram mostrados como sendo estimulados pela testosterona (HONDA; UNEMOTO; KOGO, 1999; TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2002; PUTTABYATAPPA et al., 2013) (figura 5).

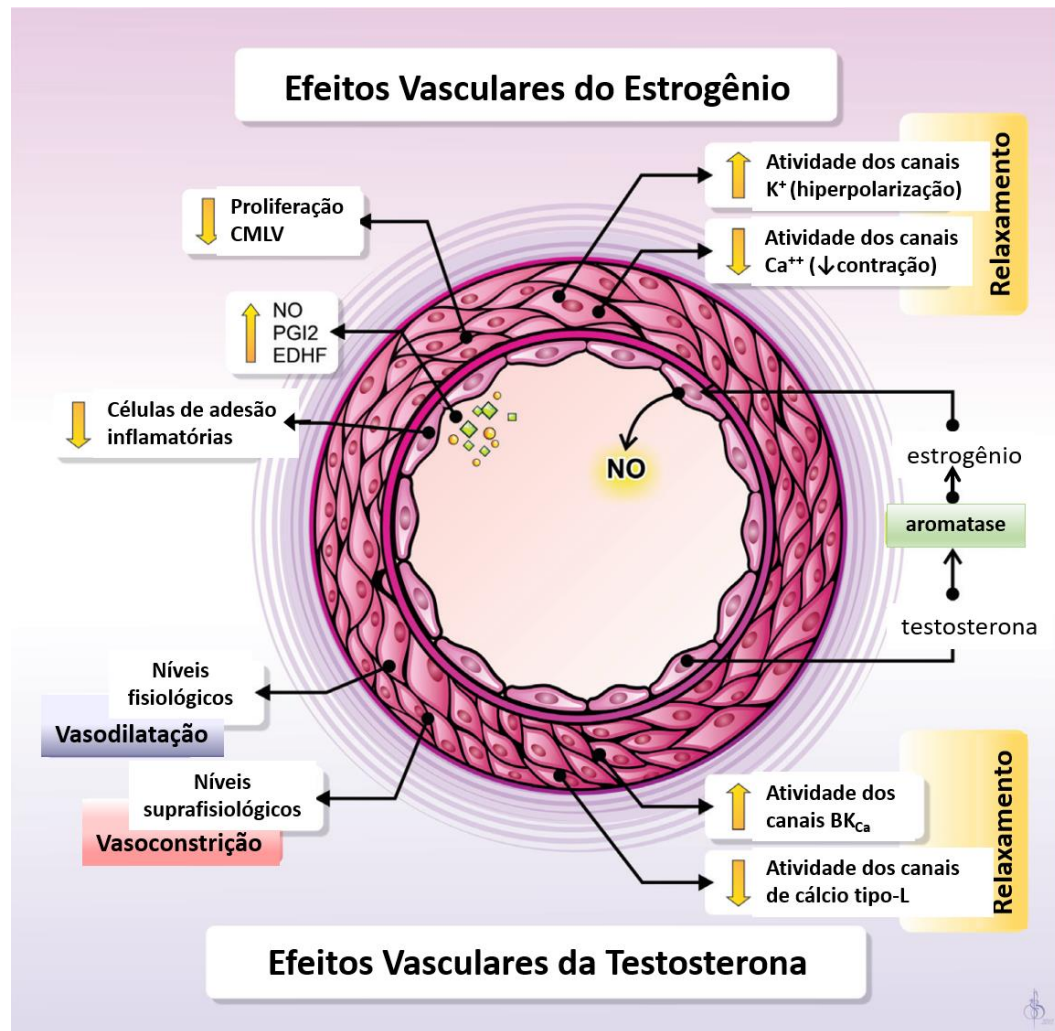


Figura 5. Ações vasculares do estrogênio e da testosterona. NO: óxido nítrico; PGI2: prostaciclina; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio; CMLV: células do músculo liso vascular; BK_{Ca} : Canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância. Adaptado de dos Santos e cols. (2014)

Assim como a testosterona, os efeitos dos EAA sobre a vasculatura também são conflitantes. Além disso, poucos são os estudos abordando o mecanismo de ação destes esteroides sintéticos sobre a função vascular e endotelial. Ebenbichler e cols. (2001) e Lane e cols. (2006) examinaram a função arterial de fisiculturistas usuários de EAA por meio da dilatação mediada por fluxo (dependente do endotélio) e induzida por nitroglicerina sublingual (independente do endotélio), observando menor dilatação dos usuários em relação ao grupo controle. Outros autores, no entanto, não observaram anomalias estruturais ou funcionais em artérias sistêmicas ou alteração

na função vascular em usuários de EAA ao empregar metodologia semelhante à descrita anteriormente (SADER et al., 2001; HASHEMI et al., 2005). As observações descritas em humanos também se estendem aos estudos utilizando animais, com relatos de EAA em doses supra terapêuticas não modificando (CUNHA et al., 2005; FRANQUINI et al., 2013) ou induzindo um prejuízo na reatividade vascular em ambos vasos de condutância e resistência (FERRER et al., 1994; SUN et al., 2013). Os mecanismos pelos quais os EAA induzem disfunção vascular parecem envolver a via do NO (KASIKCIOGLU et al., 2007; SUN et al., 2013) e o aumento da adesão leucocitária nas células endoteliais (MCCROHON et al., 1999).

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E EAA

A atividade física regular é considerada um importante componente na promoção de saúde e estilo de vida saudável. Tal informação é reforçada por inúmeros estudos que ligam a atividade física regular a uma ampla gama de benefícios para a saúde física e mental, incluindo a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como as DCVs (KRUK, 2007; BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2012; APOSTOLOPOULOS et al., 2014; LAVIE et al., 2015). A atividade física é eficaz na redução do índice de massa corporal e tecido adiposo, aumenta a resistência dos músculos, ossos e articulações, melhora o perfil lipídico, inflamatório e a sensibilidade à insulina, reduz a pressão arterial, assim como possui efeitos benéficos sobre depressão e ansiedade (MORAES et al., 2012a, 2012b; THOMPSON et al., 2012; JOSEFSSON; LINDWALL; ARCHER, 2014; PASSOS; GONÇALVES, 2014; RODRIGUES et al., 2014; LIRA et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), atividade física é definida como “qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que requer gasto de energia” (ORGANIZATION, 2016) podendo ser categorizada em ocupacional, condicionada a alguns tipos de esportes ou mesmo afazeres domésticos (e.g. subir e descer escadas, jardinagem, caminhadas, dança). O elemento comum é que estas atividades resultam em gasto de energia substancial, embora a intensidade e duração possam variar consideravelmente (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985). O exercício (ou exercício físico) fica, neste interim, classificado como uma subcategoria de atividade física na qual movimentos corporais repetitivos, planejados e/ou estruturados são realizados para melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física (HOWLEY, 2001).

De acordo com suas características, o exercício pode ser classificado como exercício aeróbico ou de resistência. O exercício aeróbico se caracteriza por movimentos voluntários com processos metabólicos de produção de energia dependente de oxigênio, em que o sistema cardiorrespiratório é determinante (e.g. corrida e ciclismo) (HOWLEY, 2001). Tal exercício caracteriza-se pelo aumento do fluxo sanguíneo central e periférico e por promover maior capacidade das fibras musculares em gerar uma maior quantidade de adenosina trifosfato (ATP) (SILVA, 2013). Em contraste, no exercício contra-resistência ocorrem contrações voluntárias da musculatura esquelética de um determinado seguimento corporal contra alguma resistência externa (e.g. levantamento de peso e musculação) (CAL ABAD et al., 2010). Dessa forma, os exercícios de resistência proporcionam aumento de força, potência, resistência muscular localizada, equilíbrio e/ou coordenação motora, dependendo da especificidade do programa, carga e número de repetições (KRAEMER; RATAMESS, 2004).

Por apresentarem propriedades mecânicas diferentes, os efeitos agudos produzidos por cada tipo de exercício físico (aeróbico e contra-resistência) são distintos e já foram documentados especialmente em relação às variáveis musculares (KRAEMER; RATAMESS, 2004) e hemodinâmicas (BRUM et al., 2004). Em uma revisão realizada por Cardoso e cols. (2010) acerca dos efeitos agudos e crônicos dos exercícios aeróbico e contra-resistência sobre a pressão sanguínea, as ações favoráveis do exercício aeróbico na redução da pressão arterial em pacientes normotensos e hipertensos foram claras, sendo este tipo de exercício indicado como ferramenta não-farmacológica no controle e tratamento da hipertensão. Os dados provenientes de exercícios contra resistência, por outro lado, não foram conclusivos.

De fato, as modificações fisiológicas induzidas pelo exercício aeróbico e que contribuem para a obtenção de um fenótipo cardioprotetor são bem descritas na literatura e incluem, por exemplo, melhora da função vascular e endotelial, mudanças anatômicas e fisiológicas nas artérias coronarianas, aumento na capacidade cardíaca antioxidante, melhor função contrátil cardíaca (GOLBIDI; LAHER, 2011; ASHOR et al., 2015; SIASOS et al., 2015; LEE; OH, 2016). Os exercícios contra-resistência, por sua vez, proporcionam modificações musculoesqueléticas benéficas evidentes e comprovadas (KING, 2001), ao passo que os efeitos cardiovasculares desse tipo de exercício foram pouco estudados e, em relação às variáveis como pressão arterial de repouso (LÚCIA et al., 2003; CARDOSO et al., 2010; MORAES et al., 2012a), função vascular e endotelial (ASHOR et al., 2015; SIASOS et al., 2015), complacência arterial (MIYACHI et al., 2004), e função cardíaca (MELO et al., 2015) os dados se mostram bastante controversos. De maneira geral, as adaptações fisiológicas induzidas pelo exercício ou atividade física são agudos (ocorrem nas primeiras horas após uma sessão de atividade física) ou crônicos (ocorrem ao longo do tempo devido a

alterações na estrutura ou na função de vários sistemas, independente dos efeitos agudos) e variam de acordo com idade, sexo, predisposições genéticas e perfil do exercício (tipo, duração, frequência, intensidade) (LAVIE et al., 2015).

O exercício físico, principalmente o do tipo contra a resistência, é frequentemente associado a agentes ergogênicos (fator ou fenômeno que aprimora o desempenho, não apenas atlético, mas também emocional e psíquico para a realização do trabalho físico) com a finalidade de melhorar o desempenho das atividades físicas (THEIN; THEIN; LANDRY, 1995). Os recursos ergogênicos incluem componentes nutricionais (e.g. carboidratos, proteínas, vitaminas), fisiológicos (e.g. adaptação a altitude, aumento de glóbulos vermelhos), psicológicos (e.g. auto verbalizações, ensaios de projeções), mecânicos (e.g. equipamentos e tipos de traje/vestimenta) ou farmacológicos (STRICKER, 1998; CUNHA et al., 2004). Estes últimos são, no entanto, os mais conhecidos e representam um grande problema ético e para a própria legislação esportiva (BARROS NETO, 2001).

Dentre os agentes ergogênicos farmacológicos, os EAA ocupam lugar de destaque, sendo o grupo de substâncias mais utilizadas no processo de *doping* e copiladas na lista de substâncias proibidas da Agência Mundial Anti-*Doping* (WORLD ANTI-DOPING AGENCY - WADA, 2017). O efeito anabolizante destes compostos associado à prática de exercícios com pesos proporciona aos usuários praticantes de modalidades esportivas profissionais bem como aos usuários de EAA recreacionais aumento das reservas energéticas musculares, da massa muscular e resistência ao treinamento de alta intensidade (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002; CUNHA et al., 2006). Todavia, estudos experimentais prévios indicam uma associação negativa entre o uso de EAA em doses supra terapêuticas e os efeitos benéficos sobre o SCV conferidos pela prática do exercício físico.

As adaptações fisiológicas promovidas pelo exercício físico regular sobre a função vascular são perdidas quando a atividade física é associada ao uso de EAA. Sun e cols. (2013) descreveram que anéis de aorta provenientes de ratos machos tratados com DN por 8 semanas e submetidos a corrida em esteira apresentaram um menor relaxamento vascular, menor biodisponibilidade de NO e expressão proteica de eNOS bem como menor expressão de marcadores endógenos antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) quando comparado aos segmentos arteriais obtidos de animais treinados e tratados com veículo. Dados similares de atenuação das respostas adaptativas vasculares ao exercício foram mostrados por Bruder-Nascimento & Cordellini (2011) utilizando um diferente protocolo de exercício.

A proteção conferida pelo exercício físico sobre coração também é perdida com o uso de EAA. A associação do tratamento com DN com exercício físico quando comparado ao exercício físico isolado, por exemplo, levou a um aumento da frequência cardíaca, hipertrofia cardíaca patológica, prejuízo da função contrátil durante protocolo de isquemia-reperfusão e atenuação da vascularização induzida pelo exercício (resultando em prejuízo do fornecimento de oxigênio ao miocárdio) em roedores (TAGARAKIS et al., 2000; DAS NEVES et al., 2013; HASSAN; KAMAL, 2013). Outros estudos apontam disfunção parassimpática e alterações na repolarização ventricular (MARQUES NETO et al., 2013), redução da atividade de enzimas antioxidantes no ventrículo esquerdo (CHAVES et al., 2006) e prejuízo na hemodinâmica ventricular esquerda (aumento da $+dP/dt$ e redução da $-dP/dt$) (ROCHA et al., 2007).

Corroborando os dados obtidos de estudos em animais, Maior e cols. (2013) mostraram que EAA induziram disfunção autonômica cardíaca (dominância simpática e reduzida modulação vagal da frequência cardíaca) em indivíduos praticantes de atividades físicas. Urhausen; Albers; Kindermann (2004) demonstraram que, mesmo

após anos de descontinuação do uso de EAA, atletas de levantamento de peso ainda mostram hipertrofia ventricular esquerda concêntrica em comparação com atletas do mesmo tipo de esporte e que nunca fizeram uso de esteroides. Adicionalmente, diversos relatos de caso vinculam o uso de EAA à morte de fisiculturistas ou praticantes de exercícios físicos contra a resistência (FINESCHI et al., 2001; SAHRAIAN et al., 2004; AHLGRIM; GUGLIN, 2009).

1.4 JUSTIFICATIVA

O uso de EAA para fins estéticos ou ergogênicos tornou-se mais difundido nos últimos 40 anos, entretanto as informações clínicas referentes aos efeitos adversos causados por tais drogas permanecem pouco conhecidas e pouco investigadas. Apesar da mídia influenciar uma mudança no perfil de usuários ilícitos de EAA de atletas de elite para a comunidade em geral bem como o uso destes compostos entre adultos do sexo masculino, relatos mostrando a autoadministração de doses supra terapêuticas de EAA por adolescentes em idade escolar e mulheres (CLARK et al., 2006) tem causado preocupação de integrantes das políticas de saúde pública e da comunidade científica.

Dados epidemiológicos apontam que o consumo de EAA é maior entre homens que em mulheres (SAGOE et al., 2014). Todavia, algumas centenas de milhares de usuários atuais de EAA são meninas e mulheres jovens (ELLIOT et al., 2007; EISENBERG; WALL; NEUMARK-SZTAINER, 2012), grupo que apresenta o crescimento mais acentuado de usuários ilícitos de esteroides (JOHNSTON et al., 2013). As consequências indesejáveis do abuso de EAA têm um efeito prejudicial particular em mulheres e adolescentes. Nestes últimos, a exposição a altos níveis de

esteroides sintéticos durante a fase de desenvolvimento biológico e comportamental, que é altamente hormônio-sensível, pode acarretar alterações físicas, psicológicas e comportamentais irreversíveis (SATO et al., 2008). Em mulheres, alterações na fisiologia reprodutiva e endócrina, geralmente permanentes, representam preocupações adicionais sobre os efeitos da exposição crônica a EAA (PENATTI et al., 2011; BELARDIN et al., 2014).

Embora o número de usuários ilícitos de EAA do sexo feminino não seja tão expressivo quando comparado ao sexo oposto, compreender a influência de fatores como sexo sobre a resposta fisiológica frente ao abuso de esteroides é de grande importância. Mais especificamente, o entendimento das ações sexo-específicas dos EAA sobre o SCV é particularmente relevante uma vez que tal sistema é um dos maiores alvos dos efeitos adversos do uso abusivo dessas drogas. O dimorfismo sexual frente a diversas variáveis como hipertensão, doença arterial coronariana e reatividade vascular são evidentes tanto em humanos quanto em animais (DART; DU; KINGWELL, 2002; ORSHAL; KHALIL, 2004; PERUSQUÍA; STALLONE, 2010). Na vasculatura, por exemplo, os hormônios sexuais apresentam efeitos distintos, conferindo fenótipos particulares à homens e mulheres, sendo estas últimas beneficiárias de um efeito vasoprotetor até a instalação da menopausa. Deste modo, é notório ressaltar que dados obtidos em estudos conduzidos em machos não devem ser extrapolados para fêmeas.

Apesar de evidências abrangentes indicando os efeitos dos hormônios sexuais sobre a função endotelial e reatividade vascular, poucos estudos avaliando os efeitos dos EAA sobre a função vascular foram realizados em fêmeas (OBASANJO; CLARKSON; WEAVER, 1996; MCCREDIE et al., 1998). De fato, estudos clínicos e de ciência básica mostrando os efeitos de doses supra terapêuticas de EAA sobre a vasculatura

foram realizados principalmente no sexo masculino (SADER et al., 2001; CASTOR; OBA; PEREIRA, 2009; FRANQUNI et al., 2013; SUN et al., 2013). Enquanto alguns dados apontam EAA promovendo um comprometimento da função endotelial e da reatividade vascular em ambos humanos e animais (FERRER et al., 1994; LANE et al., 2006; BRUDER-NASCIMENTO; CORDELLINI, 2011), outros estudos não mostram diferenças entre o grupo tratado com esteroides e grupo veículo (CUNHA et al., 2005; HASHEMI et al., 2005; FRANQUNI et al., 2013).

Mediante o cenário apresentado, determinar os efeitos fisiopatológicos dos EAA sobre o sistema vascular feminino é especialmente importante devido as particularidades cardioprotetoras deste sexo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a reatividade vascular do leito mesentérico de ratas fêmeas intactas ou ovariectomizadas tratadas com DN e submetidas ou não a um protocolo de treinamento físico contra-resistência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o tratamento com DN, o treinamento físico ou a interação entre esses dois fatores são capazes de alterar a reatividade vascular e a sensibilidade à acetilcolina em fêmeas intactas e ovariectomizadas;
- Estudar a participação da via do NO, do EDHF e dos PGs sobre a resposta vasodilatadora mediada pela acetilcolina em fêmeas intactas e ovariectomizadas;
- Verificar se o tratamento com DN, o treinamento físico ou a interação entre esses dois fatores alteram a expressão proteica de enzimas envolvidas com a via do NO (isoformas endotelial e induzível da NOS, Akt, e NADPH oxidase) em fêmeas intactas e ovariectomizadas;
- Examinar os efeitos do tratamento com DN, do treinamento físico ou da interação entre esses dois fatores sobre os parâmetros biométricos e níveis circulantes de hormônios sexuais em fêmeas intactas e ovariectomizadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso corporal variando 180-200 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O uso e cuidado destes animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015) e aprovados pelo Comissão de Ética em Pesquisa para o uso de animais de experimentação da UFES (CEUA-UFES: 031/2012).

Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h, luzes acessas 7:00h) e temperatura controlada de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa. As gaiolas individuais permitiram o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração (Purina Labina, SP-Brasil).

3.2 ESTUDO 1 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM DN EM RATAS INTACTAS SEDENTÁRIAS E TREINADAS

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais e todos os animais foram submetidos a cirurgia fictícia (Sham):

- Grupo VEH + SED: Fêmeas tratadas com veículo e não submetidas a treinamento físico;

- Grupo DN + SED: Fêmeas tratadas com DN e não submetidas a treinamento físico;
- Grupo VEH + EXC: Fêmeas tratadas com veículo e submetidas a treinamento físico;
- Grupo DN + EXC: Fêmeas tratadas com ND e submetidas a treinamento físico.

3.2.1 Protocolo estudo 1

Os experimentos foram realizados de acordo com o seguinte cronograma (figura 6):

- 1º dia: Verificação do peso corporal, cirurgia fictícia (sham)
- 16º ao 20º dia: Adaptação dos animais dos grupos EXC ao meio líquido
- 21º dia: Início dos tratamentos e do treinamento físico contra resistência
- 49º dia: Final dos tratamentos e do treinamento físico contra resistência
- 49º ao 52º dia: Experimentos de reatividade vascular, coleta de sangue, retirada e pesagem dos órgãos; armazenamento da artéria e ramos mesentéricos para análise de expressão proteica.

Os experimentos foram realizados entre o 49º e 52º dia do protocolo experimental devido a variação do ciclo estral das fêmeas. Em todos os animais os experimentos foram realizados na fase proestro, pelo menos 24h após a última sessão de treinamento físico e após 2-5 dias da última dose de DN ou VEH.

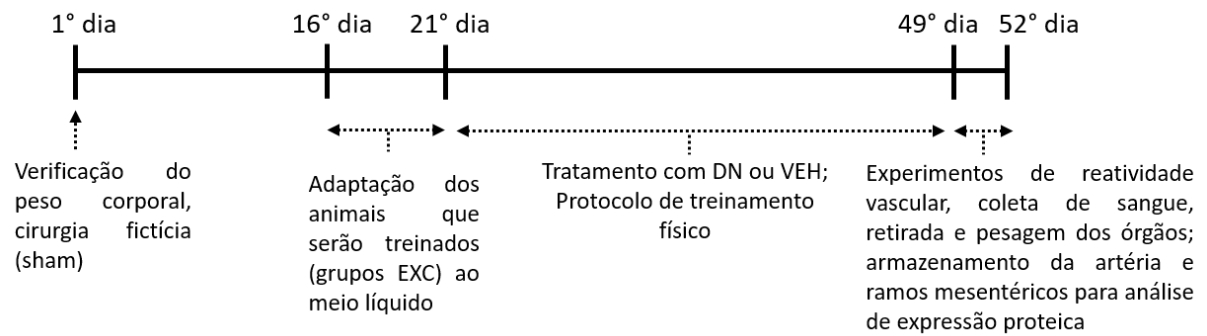


Figura 6. Cronograma do protocolo utilizado no Estudo 1.

3.3 ESTUDO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E HORMONAIS E DO PERFIL DE REATIVIDADE VASCULAR ENTRE FÊMEAS TRATADAS COM DN E FÊMEAS OVARECTOMIZADAS

Os animais foram separados em 3 grupos experimentais:

- Grupo SHAM: Fêmeas tratadas com veículo;
- Grupo SHAM + ND: Fêmeas tratadas com DN (com finalidade de otimização do número de animais, este grupo é o mesmo que ND + SED do Estudo 1);
- Grupo OVX: Fêmeas ovariectomizadas.

3.3.1 Protocolo estudo 2

Os experimentos foram realizados de acordo com o seguinte cronograma (figura 7):

- 1º dia: Verificação do peso corporal seguido de ovariectomia, a exceção das fêmeas do grupo Sham, que sofreram cirurgia fictícia.
- 21º dia: Verificação do peso corporal e início dos tratamentos

- Grupo OVEH + EXC: Fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo e submetidas a treinamento físico;
- Grupo ODN + EXC: Fêmeas ovariectomizadas tratadas com ND e submetidas a treinamento físico.

3.4.1 Protocolo estudo 3

Os experimentos foram realizados seguindo-se o seguinte cronograma (figura 8):

- 1º dia: Verificação do peso corporal seguido de ovariectomia
- 16º ao 20º dia: Adaptação dos animais dos grupos EXC ao meio líquido
- 21º dia: Início dos tratamentos e do treinamento físico contra resistência
- 49º dia: Final dos tratamentos e do treinamento físico contra resistência
- 49º ao 52º dia: Experimentos de reatividade vascular, coleta de sangue, retirada e pesagem dos órgãos; armazenamento da artéria e ramos mesentéricos para análise de expressão proteica.

Os experimentos foram realizados entre o 49º e 52º dia do protocolo experimental de modo a manter consistência ao realizado nos estudos 1 e 2. Em todos os animais os experimentos foram realizados na fase proestro, pelo menos 24h após a última sessão de treinamento físico e após 2-5 dias da última dose de DN ou VEH.

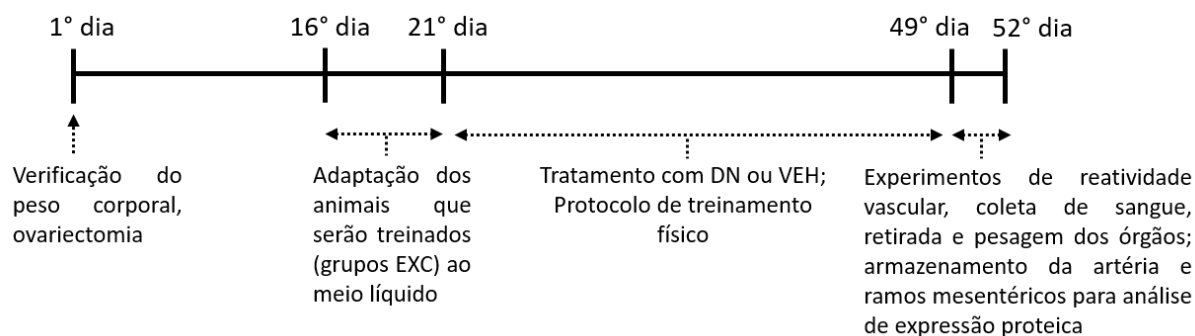


Figura 8. Cronograma do protocolo utilizado no Estudo 3.

3.5 TRATAMENTOS

Os grupos tratados com o EAA receberam DN (Deca Durabolin®, Organon, São Paulo) na dose de 20 mg/Kg por semana (intramuscular; i.m.) durante 4 semanas. As doses foram divididas em duas aplicações de DN (10 mg/Kg cada dose) por semana. Volumes iguais de veículo (óleo de amendoim e álcool benzílico 90:10 v/v) foram injetados nos animais do grupo VEH em dias semelhantes às aplicações do grupo esteroide. O regime de tratamento do EAA foi escolhido baseado em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa e outros autores (FRANQUINI et al., 2013; SUN et al., 2013).

O tratamento foi iniciado concomitantemente ao protocolo de treinamento físico. Nos estudos deste trabalho o tratamento teve início 21 dias após o procedimento de ovariectomia/cirurgia fictícia. O período de três semanas foi pré-estabelecido pois foi identificado por nosso grupo (LAMAS, 2009; DE MEDEIROS et al., 2012) como tempo necessário para que os animais ovariectomizados apresentassem alterações de reatividade vascular.

3.6 PROCEDIMENTOS GERAIS

3.6.1 Avaliação de ganho de peso, ingestão de ração, índice de adiposidade e peso dos órgãos

Durante o estudo o consumo de ração e o peso corporal dos animais foram avaliados diariamente. A ingestão de ração de cada rata foi determinada pela subtração da quantidade de ração remanescente pela quantidade de ração colocada em cada gaiola individual no dia anterior. As aferições de peso corporal e consumo de ração diários tiveram início juntamente com os tratamentos e se estenderam até o final do protocolo experimental (4 semanas).

Ao final do protocolo experimental os animais foram sacrificados, o útero, os ovários e o músculo gastrocnêmio foram isolados, lavados com solução fisiológica e o excesso de líquido foi removido com papel de filtro. A diminuição ou o aumento de massa dos órgãos foi estimado dividindo o peso do órgão (mg) pelo comprimento da tíbia (cm) (YIN et al., 1982). Para a avaliação do índice de adiposidade, os tecidos adiposos brancos epididimal, retroperitoneal e inguinal foram dissecados e pesados. A massa gorda corporal (MG) foi caracterizada pela soma desses três depósitos de gordura branca. O índice de adiposidade foi calculado por meio da relação: $MG \times 100 / \text{peso corporal final}$. Diversos autores utilizam este índice para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores (HARRISON et al., 2002; ABREU et al., 2014)

3.6.2 Determinação do ciclo estral

Os animais foram submetidos à avaliação do ciclo estral para verificar a ciclicidade normal e fase das ratas ((I) estro, (II) metraestro, (III) diestro e (IV) proestro; figura 9). Para este procedimento, 20 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) foram introduzidos gentilmente na cavidade vaginal das ratas com o auxílio de uma micropipeta, e realizados movimentos circulares suaves para retirada do conteúdo vaginal. Em seguida este material foi aplicado a uma lâmina de vidro junto a uma gota de solução de lugol para análise em microscópio (GOMES et al., 2012; DALPIAZ et al., 2013). Os esfregaços vaginais foram realizados pelo menos sete dias consecutivos antes do final do protocolo experimental, e o experimento só foi realizado quando as ratas não tratadas com DN se encontravam em proestro. Tal padronização foi realizada a fim de se evitar a influência da variação hormonal nas diferentes fases do ciclo estral sobre os parâmetros estudados (DALLE LUCCA; ADEAGBO; ALSIP, 2000).

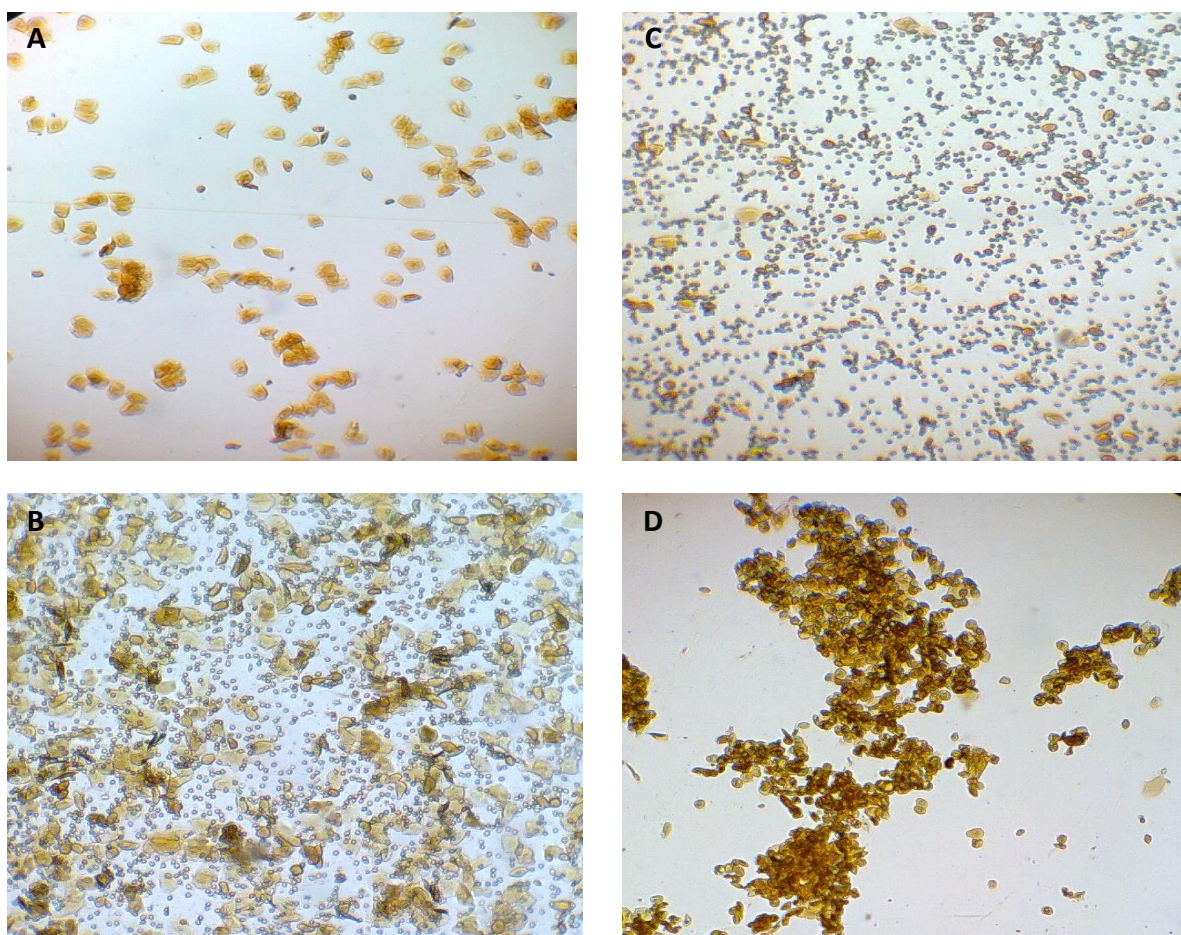


Figura 9. Fases do ciclo estral detectadas através de esfregaço vaginal em microscópio ótico com aumento de 20x. (A) Estro, caracterizada pela presença predominante de células escamosas; (B) Metaestro, presença de células escamosas, nucleadas e leucócitos em quantidade semelhante; (C) Diestro, caracterizada por infiltrado leucocitário e (D) Proestro, caracterizada pela presença predominante de células nucleadas.

3.6.3 Ovariectomia

Após anestesia intraperitoneal (i.p.) com mistura de ketamina (100mg.kg^{-1}) e xilazina (10mg.kg^{-1}), os animais tiveram a região dos flancos tricotomizados e assepsiados com álcool iodado. Os animais foram mantidos em decúbito lateral e uma incisão de aproximadamente 1 cm foi feita na pele entre a última costela e a coxa à 1 cm da linha mediana, perpendicular a calda e paralela a coluna vertebral. A musculatura abdominal subjacente a pele foi divulsionada até o alcance da cavidade peritoneal, seguida da exteriorização dos ovários e trompas. Uma linha de sutura absorvível foi passada ao redor dos ovários para posterior ligadura da tuba uterina e remoção dos ovários. A pele e a musculatura foram então suturadas, a região foi limpa e o procedimento foi repetido no lado oposto, realizando-se a ovariectomia bilateral (figura 10).

Os animais submetidos à cirurgia fictícia (sham) tiveram uma incisão feita na pele e musculatura com posterior exposição dos ovários, porém sem remoção dos mesmos.

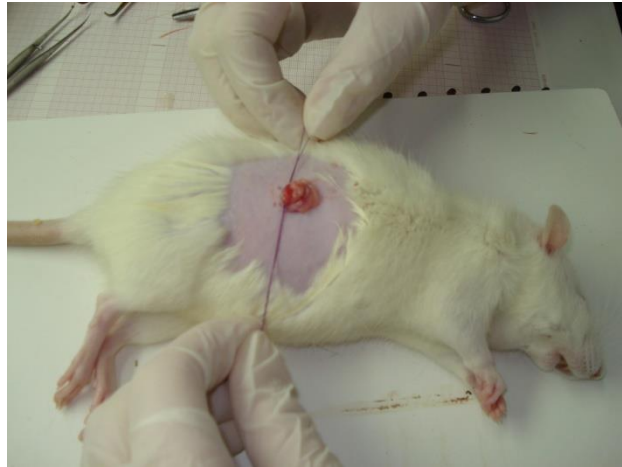


Figura 10. Fotografia da técnica de ovariectomia (CALIMAN, 2012).

3.6.4 Dosagens dos hormônios sexuais

Amostras de sangue foram coletadas no dia do experimento de reatividade vascular através de punção da artéria aorta descendente antes do isolamento do leito vascular mesentérico. O sangue coletado foi levado a centrífuga (3000 rpm, 4° C, 15 minutos) para a separação do soro e este, então, foi congelado (-80° C) até o momento do uso. A dosagem das concentrações séricas de estradiol e testosterona foi determinada por imuno ensaio enzimático (EIA), utilizando-se kit específico (DRG International Inc., Springfield, NJ, USA) e de acordo com as especificações do fabricante. Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

3.6.5 Treinamento físico

O protocolo de treinamento físico foi adaptado do método descrito anteriormente por Voltarelli e cols. (2002) (Figura 11). Antes do início do protocolo de treinamento físico todos os animais foram adaptados ao meio líquido por cinco dias consecutivos.

Durante o processo de adaptação os animais foram mantidos em um recipiente cilíndrico (50 cm diâmetro x 90 cm altura) com água aquecida ($31^{\circ}\text{C} \pm 1$) por 60 minutos sem, entretanto, serem submergidos. Os grupos submetidos ao treinamento físico realizaram duas sessões de saltos com peso em água 5 vezes por semana durante 4 semanas. Na primeira sessão de exercícios os animais foram treinados a saltar em um recipiente cilíndrico contendo um volume de água equivalente a 3 vezes a altura do animal por 6 minutos (alternância de 30 segundos de exercício seguidos de 30 segundos de descanso fora da água) com uma sobrecarga de peso equivalente a 40% da massa corporal desse animal (plaquetas de chumbo acopladas ao tórax). Após 9 minutos de intervalo/descanso, os animais foram então submetidos a segunda sessão de exercícios por 12 minutos (alternância de 60 segundos de exercício seguidos de 30 segundos de descanso fora da água) com uma sobrecarga de peso equivalente a 30% da massa corporal. A capacidade anaeróbica do treinamento físico foi determinada por meio de dosagem lactato sanguíneo (25 μL de sangue da ponta distal da calda dos animais) coletada 9 minutos ao final da segunda sessão de saltos. As concentrações de lactato foram medidas com o auxílio de um lactímetro (Tiras BM-Lactate® e Accutrend® Lactato monitorar; Roche, São Paulo, Brasil) e o exercício foi considerado anaeróbico para valores de lactato acima de 7,0 mmol/L.

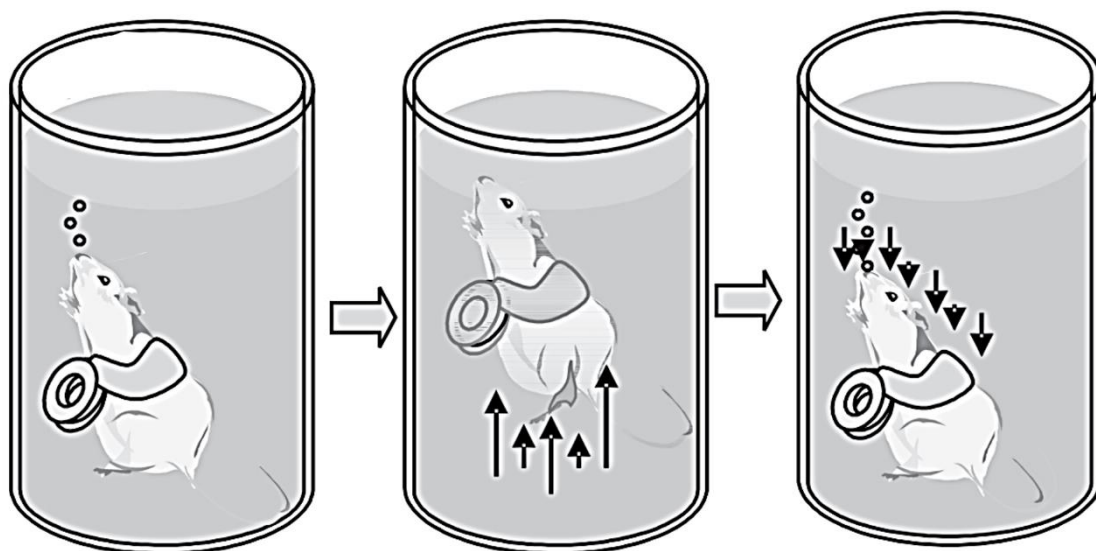


Figura 11. Ilustração do protocolo de treinamento físico (saltos em água). Adaptado de Tanno e cols. (2006).

3.6.6 Reatividade Vascular do Leito Mesentérico (LVM)

As preparações foram isoladas segundo a técnica descrita por McGregor (1965). O animal foi anestesiado (ketamina (100mg.kg^{-1}) e xilazina (10mg.kg^{-1}), i.p.), submetido a laparotomia mediana e, em seguida, a arcada mesentérica foi exposta. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada (figura 12A) e nesse vaso introduzida uma cânula de polietileno (PE50). Imediatamente, o leito foi perfundido com solução nutritora (em mM: NaCl 130; KCl 4,7; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,17; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6; KH_2PO_4 1,18; NaHCO_3 14,9; EDTA 0,026; Glicose 11,1, pH 7.4), mantido em banho-maria a 37°C e aerado constantemente através do borbulhamento de mistura carbogênica (95% O_2 /5% CO_2). Por meio de uma bomba peristáltica (Ismatec AS LaboratoriumStechnik, Switzerland) foi mantido um fluxo pulsátil de $4,0 \text{ mL/min}$, com uma pressão de perfusão média variando de $35 \pm 5 \text{ mmHg}$. O leito mesentérico (figura 12B) como um todo foi

cuidadosamente separado do intestino delgado, cortando-se rente a borda intestinal e colocado em um banho de órgão isolado.

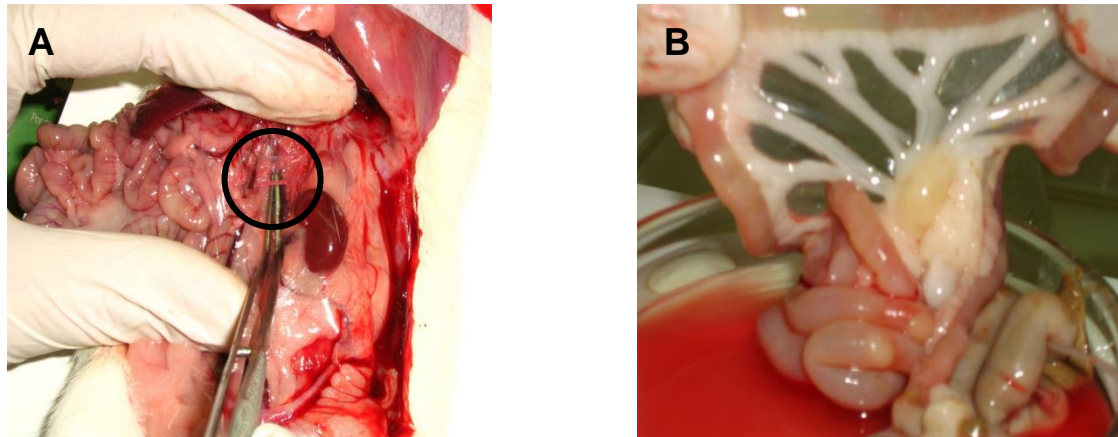


Figura 12. Em (A) fotografia da artéria mesentérica superior. Em (B) fotografia do leito mesentérico (após canulação da artéria mesentérica) sendo perfundido pela solução nutritora (CALIMAN, 2012).

A pressão de perfusão foi medida através de um transdutor de pressão e os dados foram registrados via software (AcqKnowledge for Windows; Biopac Inc.). Após um período de estabilização (20 a 30 minutos) foi induzido aumento da pressão de perfusão do LVM por vasoconstrição com uso de solução nutritora adicionada de quantidade variável de noradrenalina (NE; 0,1 a 0,3 mM) que fosse suficiente para elevação de 80-110mmHg no tônus vascular. A resposta de vaso relaxamento foi calculada como porcentagem de redução na pressão de perfusão induzida pela ACh após a contração do LVM com NE, de acordo com a seguinte equação: Relaxamento (%) = $100 \times (P2-P3) / (P2-P1)$, em que (P1) é a pressão de perfusão basal, (P2) é a pressão de perfusão basal após a contração com NE e, (P3) a redução na pressão causada pela administração de ACh.

3.6.6.1 Protocolos de estudo da reatividade vascular

Reatividade vascular à Acetilcolina (ACh) na ausência de inibidores farmacológicos

Após estabilização do registro e obtenção do platô de contração, foi construída uma curva dose-resposta a ACh, um agonista vasodilatador dependente do endotélio. Foram administradas doses *in bolus* (0,1 mL; $1,68 \times 10^{-3}$ a $1,68 \times 10^{-12}$ M) de forma crescente no LVM. As doses foram administradas em intervalos de 5-10 minutos, suficientes para que a pressão de perfusão do LVM retornasse ao seu valor basal (Figura 13). Essas curvas foram construídas na ausência de inibidores farmacológicos (curva controle), e posteriormente na presença destes.

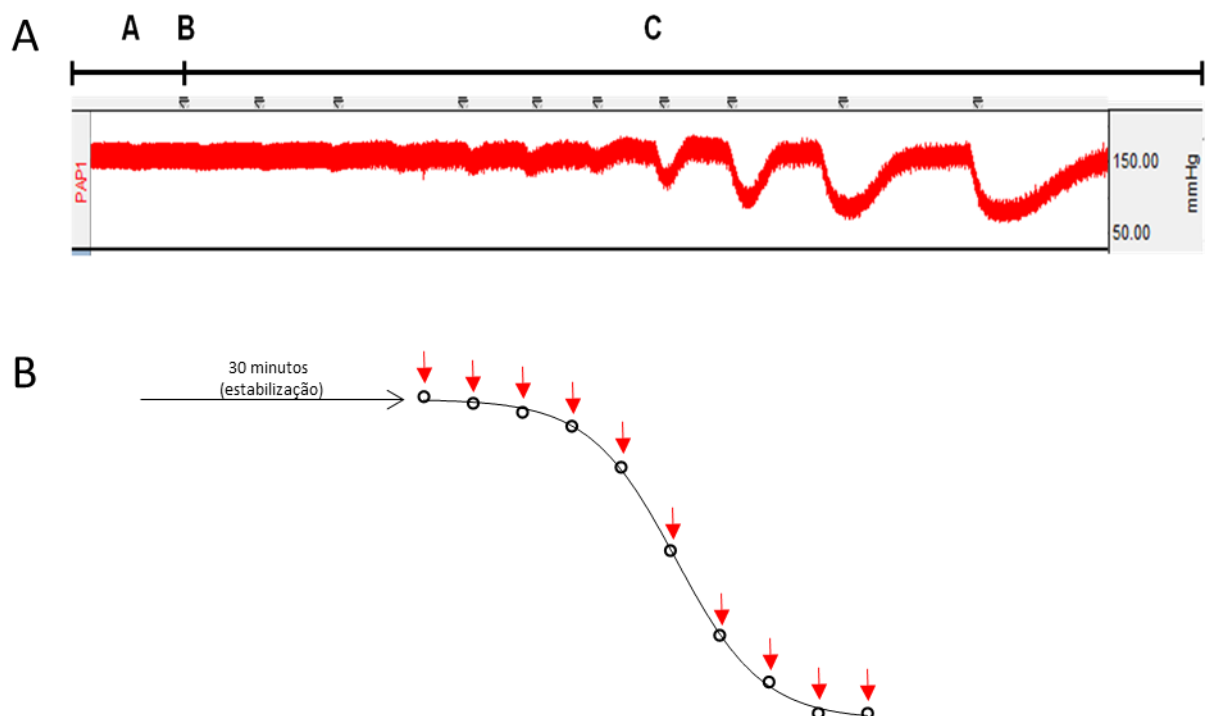


Figura 13. (A) Registro típico representativo da construção da curva dose-resposta a ACh. (A) período de estabilização inicial (30 minutos); (B) Início da administração *in bolus* de ACh; (C) Construção da curva dose-resposta frente a doses crescentes de ACh *in bolus* no LVM. O eixo vertical indica a pressão de perfusão (mmHg). (B) Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Período de

estabilização basal ou incubação com o inibidor farmacológico a ser estudado (30 minutos) seguido de curva dose-resposta à ACh (adaptado de Caliman, 2012).

Reatividade vascular à ACh na presença de inibidores farmacológicos

Para se avaliar a participação dos mediadores endoteliais sobre a resposta vascular as curvas dose-resposta foram construídas na presença de inibidores farmacológicos. Estes foram adicionados à solução nutritiva após a realização da curva controle. O LVM foi perfundido, então, por um período de 30 minutos; em seguida doses crescentes de ACh *in bolus* foram administradas para realização da curva dose-resposta.

Avaliação da participação da via do NO sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio

Para avaliar a participação do NO sobre a resposta vascular, curvas dose-resposta à ACh foram obtidas após a incubação do LVM com ambos Aminoguanidina (AG, 10^{-4} M), um inibidor da iNOS e com N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10^{-5} M), um inibidor não seletivo da NOS (CALIMAN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; LAMAS et al., 2015).

Avaliação da participação dos PGs derivados da via do ácido araquidônico-COX e do EDHF sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio

A participação do EDHF na modulação da função endotelial foi avaliada por meio da construção da curva dose-resposta à ACh na presença do bloqueio simultâneo com L-NAME (10^{-4} M) e Indometacina (INDO, $2,8 \times 10^{-6}$ M), um inibidor não seletivo da COX. A participação do EDHF no relaxamento foi definida como sendo o relaxamento residual que ocorre após inibição conjunta da NOS e da COX (CALIMAN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; LAMAS et al., 2015)

A participação dos PGs sobre as respostas vasculares foi definida como a redução da resposta de relaxamento evocada pela ACh após o bloqueio com INDO.

3.6.7 Western Blot

A análise de Western Blot foi utilizada para determinar a intensidade proteica da eNOS e sua forma fosforilada (peNOS), iNOS, Akt e sua forma fosforilada (pAkt), NADPH oxidase (subunidade gp91^{phox}). Para tanto, a árvore arterial mesentérica foi dissecada, separada de seus tecidos conectivos, de forma que os ramos de primeira, segunda, terceira e quarta ordem fossem representativos entre as amostras armazenadas. Estas foram mantidas a -80 °C até o momento da extração de proteínas, que foi realizada por meio de homogeneização em 200 µL de tampão de lise (em mM: 10 Tris-HCl (pH 7,4), 1 NaVO₃, 1% SDS, 0,5 DTT, 5 EDTA, 1 PMSF), ao qual se adicionou coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, P2714, St. Louis, EUA). A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador, sendo seguida de centrifugação a 3000 g, 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em alíquotas a -80 °C.

A determinação do conteúdo de proteína total nos ramos mesentéricos foi feita utilizando-se o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Preparou-se o reagente A (48:1:1 – carbonato de sódio 3% com 0,1 M de NaOH, tartarato de sódio/potássio 4% e sulfato de cobre 2%, respectivamente) e o reagente B (reagente de Folin-fenol Ciocalteu – 1:3 em água). A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham de 5 a 80 µg de proteína. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (5 µL) foram utilizadas como amostras. Todos os tubos de ensaio foram completados para um volume final de 250 µL, sendo posteriormente adicionado 2,5 mL da solução A. Após 10 minutos, se adicionou 0,25 mL da solução B. A absorbância foi medida a 660 nm depois de 10 minutos. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 100µL, SDS 0,002mg; DTT 0.3 mg; glicerol 100 µL; e Azul de bromofenol 10 % 25 µL; água 50 µL) e após foram mantidas à temperatura de 95 °C durante 5 minutos. Para analisar a expressão proteica da eNOS, peNOS, iNOS, Akt, pAkt, gp91^{phox} e β-actina, 60 µg das amostras foram aplicadas (carregadas) em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 7,5% (acrilamida 40%, Tris-HCl 1,5 M (pH = 8,8), SDS 1%, persulfato amônico (APS) 10% e Temed) e o gel de empacotamento a 4% (acrilamida 40%, Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS 10%, APS 10% e Temed). A eletroforese ocorreu em meio a tampão (25 mM tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glicina e 0,1% SDS) com corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura).

Uma vez separadas, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose previamente ativada. Para isso, o gel, a membrana e papel Whatman (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) foram colocados em um sistema “sanduíche”. O método realizado foi o de transferência líquida na qual o sanduíche era montado em suporte Holder Cassete e acoplado à uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,05% e Metanol 20%) à 8° C com uma corrente constante de 60 V por 1:40 horas a 4°C.

Após as transferências das proteínas as membranas foram incubadas em uma solução de bloqueio (temperatura ambiente e agitação contínua) por 2:00 horas a fim de evitar ligações inespecíficas do anticorpo. Esta solução de bloqueio continha 5% de leite desnatado em pó ou 5% de BSA dissolvido em solução de lavagem das membranas (TBS-T: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20). Em seguida, também sob agitação constante, as membranas foram incubadas por toda a noite a 4°C com os anticorpos primários anti-eNOS (1:500 BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), anti-eNOS fosforilada (Serina¹¹⁷⁷; 1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), anti-iNOS (1:500, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), anti-Akt (1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), anti-Akt fosforilada (Serina⁴⁷³; 1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), anti-gp91^{phox} (1:1000, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) ou anti-β-actin (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA).

Uma vez finalizada a incubação com os anticorpos primários as membranas foram lavadas em tampão TBS-T sob agitação leve em temperatura ambiente e então

incubadas com o correspondente anticorpo secundário conjugado com peroxidase (IgG anti-camundongo (1:5000, Abcam, Inc, Cambridge, MA, USA) e IgG anti-coelho (1:7500, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA)) por 1:30 horas, também à temperatura ambiente sob agitação constante. Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do excesso de anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a solução TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).

Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimiluminescência por meio da exposição da membrana durante 5 min a um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham™, GE Healthcare, UK). As membranas, então, foram expostas a autorradiografia (Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA / Hyperfilm, Amersham™, UK), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ (*domínio público*). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nos níveis das proteínas. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação aos grupos VEH + SED (estudo 1) ou grupo OVEH + SED (Estudo 3).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística e gráficos foram realizados utilizando-se GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Para cada curva dose-resposta a sensibilidade do agonista foi calculada através de análise de regressão não-linear na qual $pD_2 = [-$

$\log(EC_{50})$]. A fim de comparar os efeitos dos inibidores farmacológicos sobre respostas vasodilatadoras alguns resultados foram expressos como área abaixo da curva dose-resposta (AUC) ou como diferenças entre as AUC (dAUC) antes e durante o uso do inibidor farmacológico. As AUC e dAUC foram calculadas a partir das curvas dose-respostas individuais de cada animal em determinado grupo, sendo AUC expressa como valor absoluto (indica a magnitude do envolvimento de uma via) e dAUC expressa em porcentagem (mostra o envolvimento do mecanismo relativo a resposta global). Cada variável dependente foi analisada usando ANOVA uma ou duas vias regular ou de medidas repetidas. Em presença de efeitos estatísticos significantes comparações *post hoc* foram realizadas utilizando-se teste de Fisher. Test *t* não-pareados foram utilizados para comparações das concentrações de lactato sanguíneas e peso dos ovários. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO 1: EFEITOS DO TRATAMENTO COM DN EM FÊMEAS SEDENTÁRIAS OU TREINADAS

4.1.1 Características biométricas e hormonais

Na tabela 1 estão resumidas as características biométricas e hormonais dos grupos estudados. A análise estatística mostrou que o tratamento com DN, mas não o treinamento físico, aumentou o ganho de peso das fêmeas ($F_{(1,28)} = 21,31$, $P < 0,001$, $n=8$). Apesar das ratas tratadas com DN mostrarem maior peso corporal ao final do protocolo experimental, não foram observadas diferenças na ingestão de ração diária entre os grupos. Quando comparadas às fêmeas tratadas com VEH (VEH + SED e VEH + EXC), as fêmeas tratadas com DN apresentaram maior peso de útero ($F_{(1,28)} = 18,77$, $P < 0,001$, $n=8$), mas valores reduzidos de peso de ovários ($F_{(1,28)} = 9,39$, $P < 0,005$, $n=8$) (ambos expressos como valores normalizados pelo comprimento da tíbia).

O índice de adiposidade (soma dos depósitos de gordura total do corpo) e a razão do peso do músculo gastrocnêmio pelo comprimento da tíbia foram calculados a fim de se verificar o efeito anabólico do tratamento com DN e do treinamento físico sobre a massa de gordura e a massa muscular, respectivamente. Ambos tratamento com DN ($F_{(1,14)} = 16,64$, $P < 0,01$, $n=5$) quanto o treinamento físico ($F_{(1,14)} = 31,59$, $P < 0,001$, $n=5$) reduziram o índice de adiposidade, entretanto a análise estatística por meio da ANOVA de duas vias indicou que apenas o fator de tratamento ($F_{(1,22)} = 28,62$, $P < 0,001$, $n=6-8$) teve efeito significativo sobre a hipertrofia muscular nas ratas fêmeas.

Apesar deste resultado, todos os grupos EXC estavam em anaerobiose, como indicou a dosagem de lactato sanguíneo após o final de cada sessão de saltos em água (VEH + EXC: $10,67 \pm 0,85$; DN + EXC: $9,10 \pm 1,41$ mmol/L; $t_{(14)}=0,94$, $P=0,36$, $n=8$).

Com relação aos níveis hormonais, o tratamento crônico com DN ($F_{(1,15)} = 17,79$, $P = 0,001$, $n=5$), mas não o treinamento físico ($F_{(1,15)} = 1,02$, $P = 0,32$, $n=5$) ou a interação entre esses fatores ($F_{(1,15)} = 0,55$, $P = 0,46$) causou uma diminuição significativa nos níveis séricos de estradiol. Por outro lado, os níveis do hormônio testosterona apresentaram-se aumentados nos grupos DN+SED e DN+EXC ($F_{(1,13)} = 164,3$, $P < 0,001$, $n=5$ para tratamento), ao passo que o treinamento físico diminuiu ($F_{(1,13)} = 27,95$, $P < 0,001$, $n=5$) os níveis circulantes deste hormônio, com uma interação significativa entre esses fatores ($F_{(1,13)} = 23,79$, $P < 0,001$, $n=5$).

Adicionalmente, o monitoramento citológico do ciclo estral durante o protocolo experimental revelou que as fêmeas do grupo DN (DN + SED e DN + EXC) permaneceram na fase diestro após o início do tratamento com o EAA, enquanto as fêmeas tratadas com veículo apresentaram ciclicidade normal.

Tabela 1. Características biométricas e níveis hormonais dos grupos veículo sedentário (VEH + SED), Decanoato de Nandrolona (DN) sedentário (DN + SED), veículo treinado (VEH + EXC) e DN treinado (DN + EXC).

	VEH + SED	DN + SED	VEH + EXC	DN + EXC
Peso corporal inicial (g)	199,2 ± 3,4	199,7 ± 5,1	198,7 ± 3,6	195,0 ± 4,5
Peso corporal final (g)	278,6 ± 6,5	323,8 ± 6,9 ^{***}	274,0 ± 13,0	320,8 ± 8,4 ^{***}
Ganho de peso (%)	43,4 ± 4,2	68,9 ± 4,3 ^{***}	46,8 ± 5,6	65,5 ± 4,7 ^{**}
Ingestão de ração (g)	20,8 ± 0,9	20,4 ± 0,9	19,3 ± 0,7	20,8 ± 0,8
Útero/CT (mg/cm)	140,0 ± 10,8	190,4 ± 10,5 ^{***}	126,9 ± 20,8	205,0 ± 14,7 ^{***}
Ovários/CT (mg/cm)	34,2 ± 2,1	27,5 ± 2,8 [*]	33,0 ± 1,6	26,0 ± 2,0 [#]
Gastrocnêmio/CT (mg/cm)	406,4 ± 18,4	527,7 ± 19,3 ^{***}	414,4 ± 20,5	488,3 ± 14,4 ^{***}
Índice de Adiposidade (%)[‡]	5,32 ± 0,3	3,31 ± 0,3 ^{**}	2,88 ± 0,2 ^{**}	2,6 ± 0,1 ^{**}
Estrogênio (pg/mL)	52,0 ± 3,4	30,5 ± 2,8 ^{***}	62,9 ± 10,9	32,1 ± 1,0 ^{***}
Testosterona (ng/mL)	0,2 ± 0,01	2,8 ± 0,2 ^{***}	0,1 ± 0,01	1,3 ± 0,11 ^{***} ^{\$\$}

Valores estão apresentados como média ± EPM. [‡] depósitos de gordura total/peso corporal x 100; ^{**} $P < 0,01$ e ^{*} $P < 0,05$ vs grupo VEH + SED; ^{##} $P < 0,01$ e [#] $P < 0,05$ vs grupo VEH + EXC; ^{\$\$} $P < 0,01$ vs grupo DN + SED (ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher). N=8 em cada grupo para parâmetros biométricos/peso de órgãos; N=5 em cada grupo para parâmetros hormonais e índice de adiposidade. CT, comprimento de tíbia.

4.1.2 Efeitos do tratamento com DN sobre a função vascular do leito mesentérico isolado

A pressão de perfusão nos LVMs isolados foi similar entre os grupos tratados com veículo e DN em ambas as condições basal (VEH+SED: 29,8 ± 1,5; DN+SED: 33,3 ± 1,9; VEH+EXC: 30,7 ± 2,1; DN+EXC: 30,0 ± 2,5; mmHg, n=8) e após o aumento do tônus vascular com NE (VEH+SED: 127,7 ± 7,1; DN+SED: 124,6 ± 6,0; VEH+EXC: 111,9 ± 5,0; DN+EXC: 121,0 ± 4,5; mmHg, n=8).

Para avaliar se o tratamento com DN foi capaz de alterar o relaxamento dependente do endotélio, foi realizada curva dose-resposta à ACh ($1,68 \times 10^{-3}$ a $1,68 \times 10^{-12}$ M). A resposta mediada por este agonista vasodilatador produziu um relaxamento

dependente da concentração da droga em todos os grupos estudados (figura 14). No entanto, o tratamento com DN levou a um prejuízo na reatividade vascular das fêmeas sedentárias e treinadas quando comparado as fêmeas tratadas com veículo (Figura 14 e tabela 2). A resposta máxima de relaxamento dependente do endotélio induzida pela ACh nos LVMs foi significativamente menor nos animais do grupo DN (DN+SED e DN+EXC) quando comparada a resposta dos grupos VEH ($F_{(1,28)} = 10,40$, $P < 0,005$, $n=8$). O efeito do tratamento com DN sobre a resposta vasodilatadora também pode ser observada por meio da análise de AUC ($F_{(1,28)} = 10,94$, $P < 0,01$, $n=8$). O treinamento físico sozinho ou em combinação com o tratamento com DN não causou nenhuma alteração nas análises de AUC ou R_{max} induzida pela ACh. Não houveram diferenças entre os grupos VEH e DN em relação a sensibilidade a ACh (pD_2).

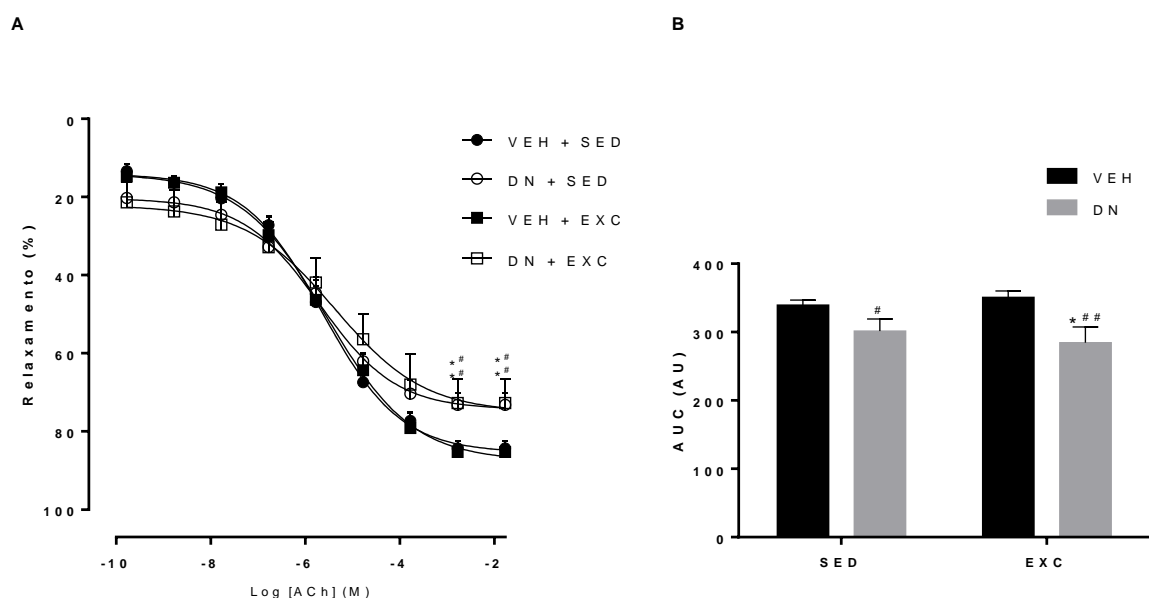


Figura 14. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (●) VEH + SED, (○) DN + SED, (■) VEH + EXC e (□) DN + EXC na ausência de inibidores farmacológicos. (B) Área abaixo da curva (AUC) dose-resposta à ACh na ausência de inibidores farmacológicos. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo VEH + SED; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ vs grupo VEH + EXC. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 2. Valores de resposta máxima (R_{\max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na ausência de inibidores.

	R_{\max} (%)	pD_2	AUC (AU)
VEH + SED	82,7 ± 2,1	5,97 ± 0,1	339,4 ± 7,5
DN + SED	73,1 ± 2,9 ^{*#}	6,03 ± 0,1	301,4 ± 17,6 [#]
VEH + EXC	84,7 ± 2,8	5,90 ± 0,1	350,8 ± 9,4
DN + EXC	72,6 ± 4,8 ^{*#}	6,13 ± 0,2	284,4 ± 23,2 ^{*##}

Valores estão apresentados como média ± EPM. R_{\max} : Resposta máxima; pD_2 : -log da concentração da droga para produzir 50% da R_{\max} ; Diferença estatística indicada por ^{*} $P < 0,05$ vs grupo VEH + SED; ^{##} $P < 0,01$ e [#] $P < 0,05$ vs grupo VEH + EXC. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. N=8/grupo

Investigação dos mecanismos envolvidos no prejuízo da reatividade vascular induzida pelo tratamento com DN em fêmeas intactas

Com objetivo de verificar a participação das vias do NO, EDHF e PG no prejuízo do relaxamento dependente do endotélio induzido pelo tratamento com DN, examinamos as repostas induzidas pela ACh na presença de inibidores específicos.

4.1.2.1 Avaliação da participação do NO na resposta de relaxamento dependente do endotélio

A modulação do NO no relaxamento induzido pela ACh foi avaliada por meio da incubação dos LVMs com AG e L-NAME.

Efeito da inibição da iNOS

Os resultados da análise estatística mostrou que o tratamento com DN ($F_{(1,28)} = 4,62$, $P = 0,04$, $n=8$) e o treinamento físico ($F_{(1,28)} = 5,03$, $P=0,03$, $n=8$), mas não a interação destes fatores ($F_{(1,28)} = 0,58$, $P =0,45$, $n=8$) influenciaram a resposta vasodilatadora induzida pela ACh após a inibição com AG, um inibidor seletivo da iNOS (figura 15, tabela 3).

A incubação dos LVMs com AG não levou a alterações nas respostas de relaxamento nos grupos VEH+SED e VEH+EXC, no entanto nos LVMs dos animais do grupo DN+SED o relaxamento foi significativamente atenuado após o bloqueio da participação da via da iNOS. O treinamento físico reverteu as alterações causadas pelo tratamento com DN, como pode ser observado no grupo DN+EXC (figura 15, tabela 3). Visando uma melhor comparação desses resultados foi calculada a participação do NO proveniente da iNOS por meio da análise da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) entre as curvas obtidas antes (curva controle) e após o bloqueio dos LVMs com AG. Desta forma, foi possível observar que a modulação endotelial pela iNOS na resposta de relaxamento induzida pela ACh é significativamente maior nos animais DN quando comparado aos grupos VEH, e que o treinamento físico diminui a participação da iNOS no vaso relaxamento ($F_{(1,28)} = 10,31$, $P < 0,01$ para tratamento; $F_{(1,28)} = 6,4$, $P < 0,05$ para exercício, $n=8$, tabela 3, figura 15B). Não houveram diferenças entre os grupos estudados em relação a sensibilidade à ACh (pD_2) após o bloqueio com AG.

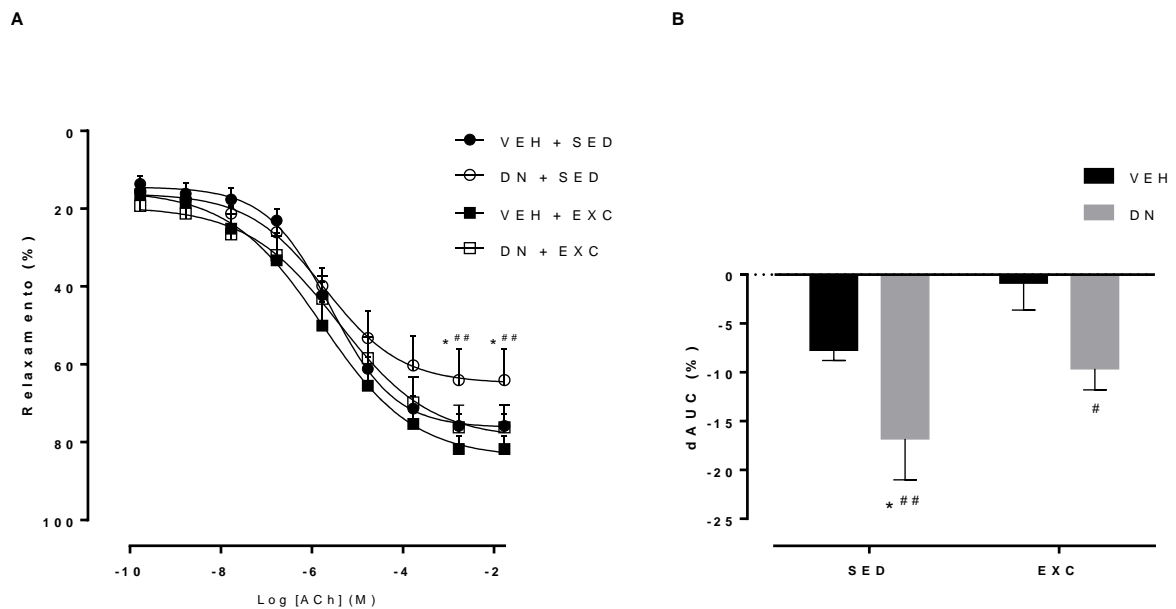


Figura 15. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (●) VEH + SED, (○) DN + SED, (■) VEH + EXC e (□) DN + EXC na presença de AG. (B) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com AG. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. * $P<0,05$ vs grupo VEH + SED; ## $P<0,01$ e # $P<0,05$ vs grupo VEH + EXC. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 3. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de AG.

	R_{max} (%)	pD_2	dAUC (%)
VEH + SED	75,8 \pm 3,0	5,81 \pm 0,1	-7,74 \pm 1,0
DN + SED	64,0 \pm 5,2*##	6,16 \pm 0,2	-16,8 \pm 4,1*##
VEH + EXC	81,7 \pm 3,2	5,94 \pm 0,1	-0,8 \pm 2,7
DN + EXC	76,1 \pm 3,2\$	6,11 \pm 0,2	-9,6 \pm 2,1#

Valores estão apresentados como média \pm EPM. R_{max} : Resposta máxima; pD_2 : -log da concentração da droga para produzir 50% da R_{max} ; Diferença estatística indicada por * $P<0,05$ vs grupo VEH + SED; ## $P<0,01$ e # $P<0,05$ vs grupo VEH + EXC; \$ $P<0,05$ vs grupo DN + SED. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. N=8/grupo

Efeito da inibição da NOS

O bloqueio dos LVMs das fêmeas sedentárias e treinadas com L-NAME promoveu uma expressiva atenuação do relaxamento vascular induzido pela ACh igualando a resposta entre os grupos (figura 16A), indicando que a diferença observada entre o grupos DN+SED e DN+EXC e os demais era provavelmente pela via do NO. Sob a condição de inibição com L-NAME as curvas dose-resposta a ACh foram deslocadas para a direita em todos os grupos, mas este deslocamento foi menor nos grupos tratados com DN do que nos grupos VEH, como mostrado pelos valores de pD_2 ($F_{(1,28)} = 6,31$, $P = 0,018$ para tratamento, $n=8$, tabela 4). Adicionalmente, o prejuízo no relaxamento mediado pelo NO nos LVMs foi maior nos grupos DN+SED e DN+EXC que nos grupos VEH, como mostrados pelos valores de $dAUC(\%)$ ($F_{(1,28)} = 12,77$, $P < 0,05$ para tratamento; $F_{(1,28)} = 12,01$, $P < 0,05$ para exercício; $F_{(1,28)} = 0,04$, $P = 0,82$ para interação; $n=8$, figura 16B). Estes resultados sugerem que o tratamento com DN leva a uma disfunção endotelial nos LVMs de fêmeas intactas por meio da redução do componente NO na participação do relaxamento vascular induzido pela ACh. Apesar de nossos dados indicarem que o treinamento físico possa ter promovido um aumento da participação de NO nos grupos EXC, este aumento não foi capaz de restaurar a alteração na via do NO induzido pelo tratamento com DN.

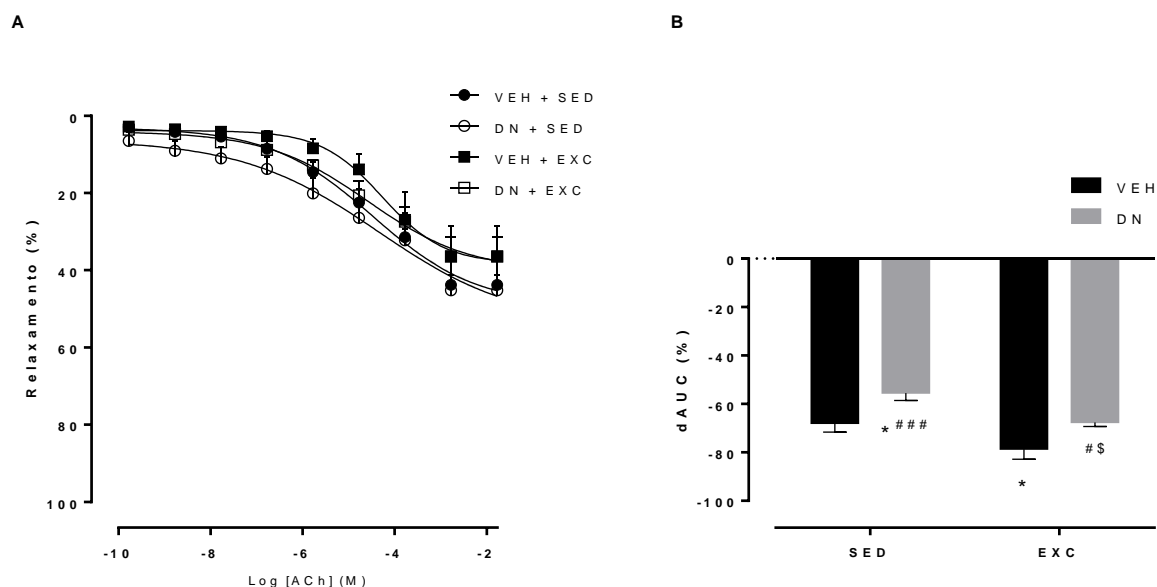


Figura 16. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (●) VEH + SED, (○) DN + SED, (■) VEH + EXC e (□) DN + EXC na presença de L-NAME. (B) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. * $P<0,05$ vs grupo VEH + SED; ### $P<0,001$ e # $P<0,05$ vs grupo VEH + EXC; \$ $P<0,05$ vs grupo DN + SED. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 4. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME.

	R_{max} (%)	pD_2	dAUC (%)
VEH + SED	43,7 \pm 6,6	4,95 \pm 0,2	-67,9 \pm 3,5
DN + SED	45,1 \pm 3,8	5,24 \pm 0,2 [#]	-55,5 \pm 3,0 ^{####}
VEH + EXC	36,3 \pm 7,7	4,49 \pm 0,2	-78,6 \pm 4,2 [*]
DN + EXC	36,4 \pm 4,9	5,22 \pm 0,1 [#]	-67,6 \pm 1,6 [#]

Valores estão apresentados como média \pm EPM. R_{max} : Resposta máxima; pD_2 : $-\log$ da concentração da droga para produzir 50% da R_{max} ; Diferença estatística indicada por * $P<0,05$ vs grupo VEH + SED; ### $P<0,001$ e # $P<0,05$ vs grupo VEH + EXC; \$ $P<0,05$ vs grupo DN + SED. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. $N=8$ /grupo

4.1.2.2 Avaliação da participação do EDHF e dos PGs na resposta de relaxamento dependente do endotélio

Efeito da inibição da NOS e PGs – avaliação da participação do EDHF

A fim de se investigar a participação do EDHF na disfunção da reatividade vascular induzida pelo tratamento com DN nas ratas fêmeas, os LVMs foram incubados com L-NAME e INDO de modo a se prevenir a formação de NO e PGs vasoativos, respectivamente. Desta forma, remanesce uma resposta vasodilatadora residual não-NO/não-PGs, que seria atribuída ao EDHF. Como mostrado na Figura 17, a inibição das vias da NOS e dos PGs promoveu uma atenuação pronunciada no relaxamento induzido pela ACh em relação à curva controle, porém não houveram diferenças entre os grupos estudados. De maneira similar, nem o tratamento com DN ou o treinamento físico foram capazes de alterar as respostas em ambos a R_{max} e na sensibilidade dos LVMs à ACh (tabela 5), sugerindo que o componente de relaxamento EDHF não foi alterado pelas variáveis tratamento ou treinamento físico. Adicionalmente, como evidenciado pelos valores de área abaixo da curva (AUC) (figura 17B), a participação do EDHF no relaxamento endotelial foi de igual magnitude entre os LVMs das fêmeas tratadas com VEH ou com DN, sugerindo que o tratamento com DN não altera a via do EDHF sobre a resposta dilatadora à ACh.

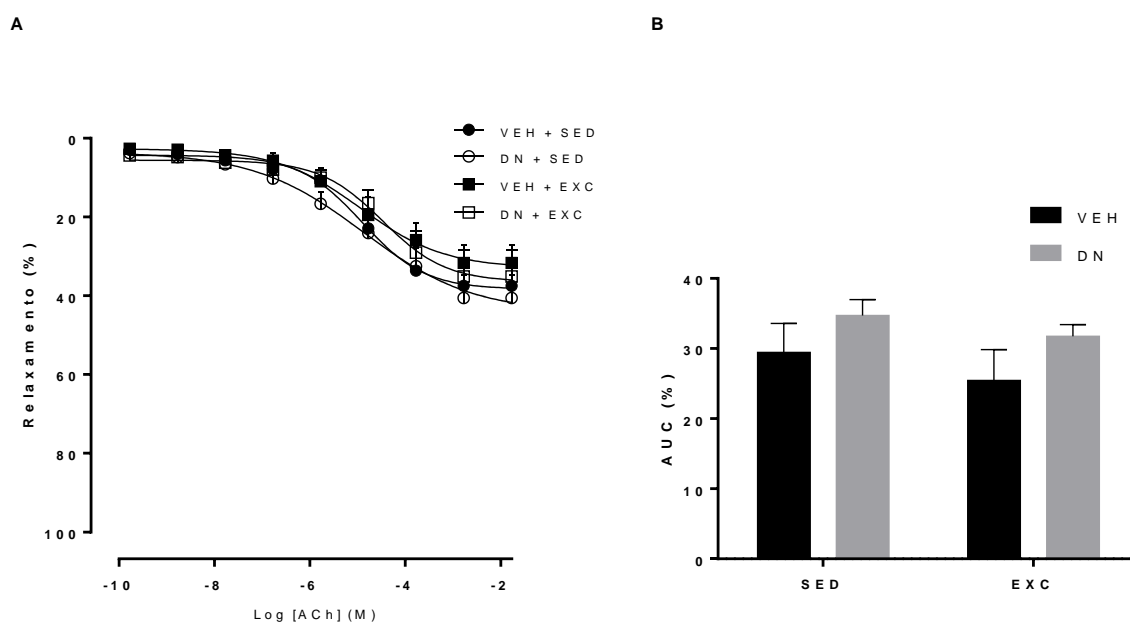


Figura 17. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (●) VEH + SED, (○) DN + SED, (■) VEH + EXC e (□) DN + EXC na presença de L-NAME + INDO. (B) Área abaixo da curva (AUC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME + INDO. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média ± EPM, n=8 por grupo. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 5. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas intactas sedentárias (SED) ou treinadas (EXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME + INDO.

	R_{max} (%)	pD_2	AUC (%)
VEH + SED	37,4±5,5	5,13 ±0,1	29,4 ± 4,1
DN + SED	40,5±5,7	5,13 ±0,2	34,7 ±2,3
VEH + EXC	31,6±4,4	5,01 ±0,2	25,4 ±4,4
DN + EXC	35,0±6,6	4,81 ±0,2	31,7 ±1,6

Valores estão apresentados como média ± EPM. R_{max} : Resposta máxima; pD_2 : -log da concentração da droga para produzir 50% da R_{max} ; ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. N=8/grupo

Efeito da inibição dos PGs

Para explorar o envolvimento dos PGs nas alterações da reatividade vascular induzidas pelo DN nós avaliamos os valores da dAUC (%) na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO, no qual a resposta evocada pela INDO representa a participação dos derivados da via do ácido araquidônico-COX nas repostas de relaxamento. Não foram encontradas diferenças entre as fêmeas tratadas com DN ou submetidas ao treinamento físico quando comparadas às dAUC (%) com os respectivos grupos controle (VEH+SED: $-16,4 \pm 9,9$; DN+SED: $-16,6 \pm 1,4$; VEH+EXC: $-11,5 \pm 6,7$; DN+EXC: $-10,3 \pm 9,8$ %dAUC, n=8; Figura 18). Adicionalmente, não houve mudança, em nenhum grupo, nas curvas dose-resposta à ACh ou R_{\max} na presença conjunta de L-NAME e INDO em comparação a resposta na presença de L-NAME sozinho (figuras 16A e 17A e tabelas 4 e 5). Esses resultados sugerem uma participação não-expressiva dos PGs nas respostas de relaxamento induzidas pela ACh nos LVMs em todos os grupos estudados.

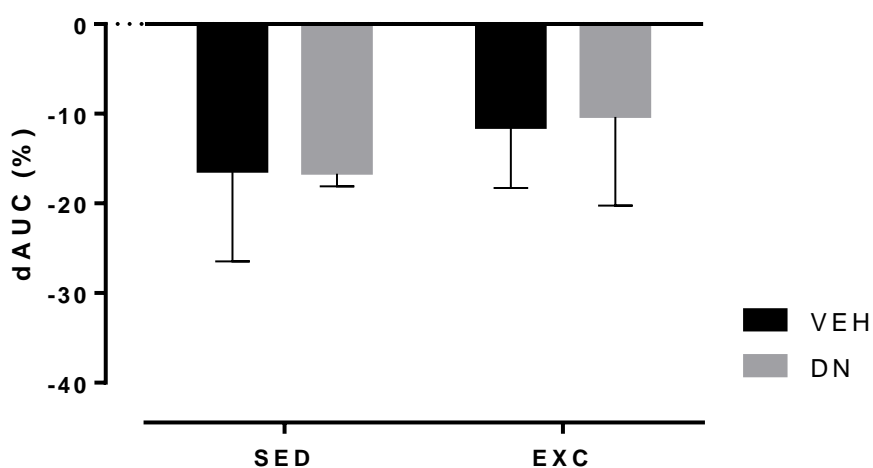


Figura 18. Diferença percentual da área abaixo da curva na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO entre os grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC. Esses dados dão informação sobre a magnitude da participação da via da COX no relaxamento à ACh. Dados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. N=8/grupo

Em resumo, nossos dados sugerem que o tratamento com DN não foi capaz de alterar os componentes de relaxamento EDHF e PGs, entretanto altera o relaxamento endotelial mediado pela via do NO.

4.1.3 Efeitos do tratamento com DN sobre a intensidade das bandas proteicas da NOS, Akt e NADPH oxidase nos LVMs de fêmeas intactas sedentárias ou treinadas

Visando examinar por qual mecanismo o tratamento com DN promoveria a redução da modulação endotelial pelo NO nas ratas fêmeas sedentárias e treinadas, comparamos a intensidade das bandas proteicas da iNOS, eNOS, Akt and NADPH oxidase nos grupos estudados. As análises por western blot nos ramos mesentéricos mostraram que o tratamento com DN promoveu uma acentuada redução na fosforilação da eNOS ($F_{(1,17)} = 6,43$, $P < 0,05$ para o tratamento, $n=5$; Figura 19A) e um aumento na intensidade da banda da iNOS quando comparado ao grupo VEH ($F_{(1,17)} = 10,06$, $P < 0,01$ para tratamento, $n=5$; Figura 19B). Nós também investigamos se o DN era capaz de induzir a fosforilação da Akt, quinase conhecida por ativar a eNOS em células endoteliais. Nós observamos nas análises de western blot que o tratamento com DN reduziu a fosforilação da Akt nos ramos mesentéricos, como evidenciado pela razão da intensidade da banda de Akt fosforilada pela Akt total [$F_{(1,17)} = 6,08$, $P < 0,05$ tratamento, $n=5$; Figura 19C]. Por último, nós avaliamos os efeitos do tratamento com DN sobre a intensidade da proteína gp91^{phox}, uma subunidade da NADPH oxidase. A intensidade da gp91^{phox} estava elevada nas fêmeas tratadas com DN quando comparadas ao grupo VEH ($F_{(1,16)} = 5,12$, $P < 0,05$

tratamento, n=5; Figura 19D]. Por outro lado, nem o exercício isolado, nem a combinação do exercício e o tratamento com DN promoveram alterações nas proteínas analisadas ($P > 0,05$).

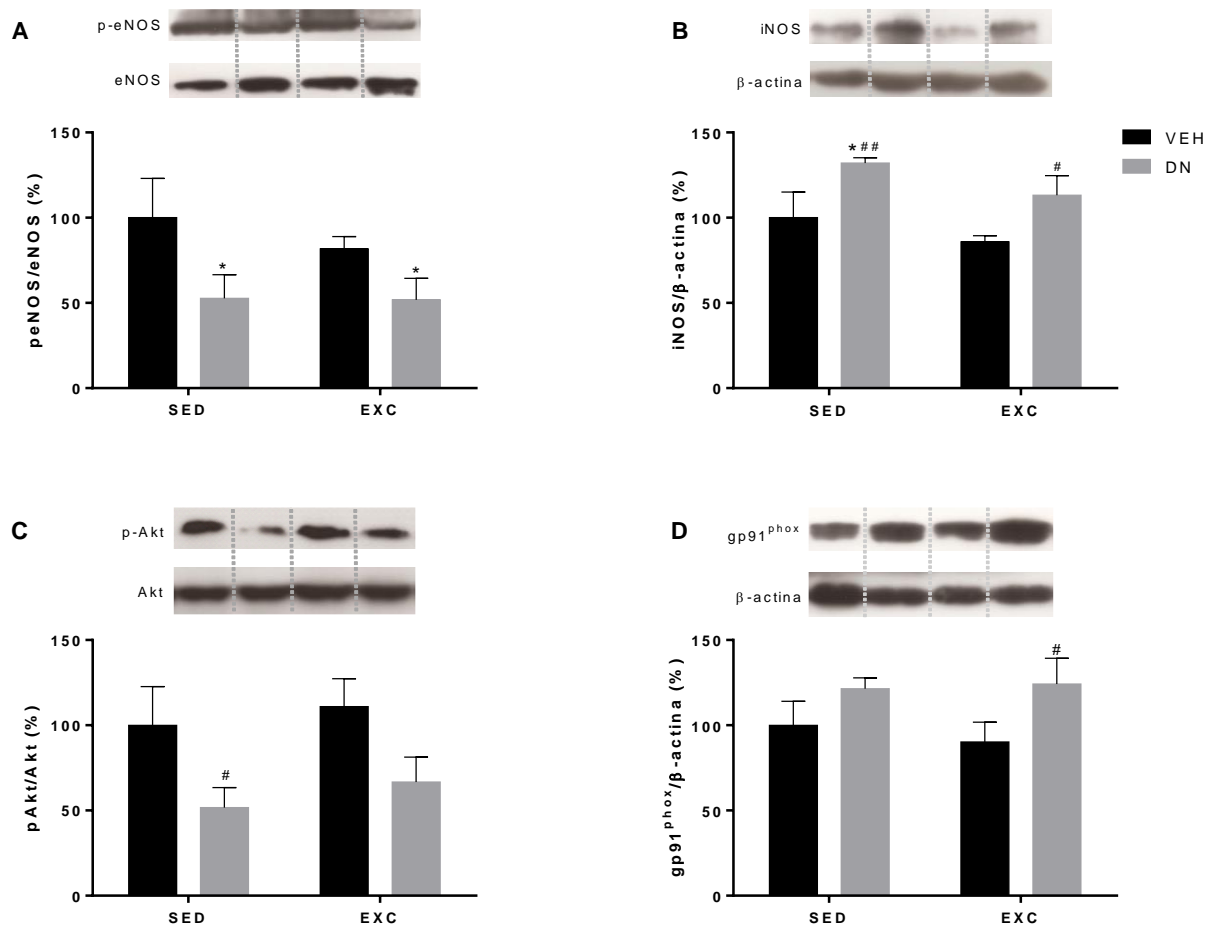


Figura 19. Resultados da intensidade da banda proteica das isoformas endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) da óxido nítrico sintase, proteína quinase B (Akt) e NADPH oxidase (gp91^{phox}) nos ramos mesentéricos nos grupos VEH + SED, DN + SED, VEH + EXC e DN + EXC. Na parte superior da figura estão as bandas representativas das respectivas proteínas. Dados estão expressos como média \pm EPM, n=5 por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo VEH + SED; *** $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ vs grupo VEH + EXC. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

4.2 ESTUDO 2: COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E HORMONAIS E PERFIL DE RESPOSTA VASCULAR DE FÊMEAS INTACTAS TRATADAS COM DN E FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS

Neste segundo conjunto de experimentos comparamos se as características biométricas e hormonais de ratas fêmeas intactas tratadas com DN eram similares as de um modelo animal de menopausa (ovariectomia) e avaliamos se o tratamento com DN induzia alterações vasculares semelhantes as alterações vasculares observadas em fêmeas ovariectomizadas.

4.2.1 Comparação entre as características biométricas e hormonais de fêmeas intactas tratadas com DN e fêmeas ovariectomizadas

Os dados referentes aos valores de peso corporal, do útero, dos ovários e do músculo gastrocnêmio, ingestão de ração, índice de adiposidade, bem como as concentrações sanguíneas de estradiol e testosterona dos animais do estudo 2 estão apresentados na tabela 6. Apesar de a média de ingestão diária de ração entre os grupos estudados ter sido similar ($F_{(2,18)} = 0,05$, $P = 0,94$, $n=8$), ambas fêmeas, OVX e tratadas com DN (SHAM + DN), apresentaram maior peso corporal final ($F_{(2,21)} = 11,96$, $P < 0,01$, $n=8$) e aumento de ganho de peso ($F_{(2,21)} = 11$, $P < 0,01$, $n=8$) quando comparadas às fêmeas SHAM. Em relação ao parâmetro peso do útero o grupo SHAM + DN apresentou valor aumentado enquanto as fêmeas OVX mostraram hipotrofia uterina ($F_{(2,21)} = 125,2$, $P < 0,001$, $n=8$). O grupo tratado com DN, entretanto, apresentou redução de peso de ovários como demonstrado nos resultados do estudo 1. Não foram encontradas diferenças no índice de adiposidade e na razão do músculo gastrocnêmio-comprimento de tíbia entre os grupos SHAM e OVX, entretanto as

fêmeas tratadas com DN apresentaram menor massa adiposa ($F_{(2,11)} = 10,57$, $P < 0,01$, $n=5$) e aumento de massa muscular ($F_{(2,18)} = 12,34$, $P < 0,001$, $n=6-8$), indicando os efeitos anabólicos do tratamento o EAA.

Como demonstrado nos resultados do estudo 1 o tratamento com DN levou a uma redução dos níveis circulantes de estradiol, cujo valor é comparável ao observado nas fêmeas do grupo OVX ($F_{(2,10)} = 9,45$, $P < 0,01$, $n=5$). Em relação a concentração de testosterona, os grupos SHAM e OVX apresentaram valores fisiológicos enquanto este hormônio estava aumentado no grupo SHAM + DN ($F_{(2,9)} = 79,30$, $P < 0,001$, $n=5$). Com relação ao acompanhamento do ciclo estral, as fêmeas OVX permaneceram com ciclicidade normal até a primeira semana após o procedimento de ovariectomia; depois deste período, as ratas permaneceram em diestro contínuo. Padrão similar foi observado nas fêmeas intactas tratadas com DN, cujo ciclo estral manteve-se na fase diestro após início do tratamento com o EAA. As fêmeas do grupo SHAM, por sua vez, apresentaram ciclicidade normal.

Coletivamente, esses resultados evidenciam os efeitos da androgenização mediada pelo tratamento com o EAA e revelam um padrão similar de alterações entre fêmeas intactas recebendo DN e ovariectomizadas.

Tabela 6. Características biométricas e níveis hormonais dos grupos SHAM (SHAM), SHAM tratado com Decanoato de Nandrolona (SHAM + DN) e ovariectomizado (OVX).

	SHAM	SHAM + ND	OVX
Peso corporal inicial (g)	196,2 ± 5,0	199,7 ± 5,1	201,7 ± 4,1
Peso corporal final (g)	283,8 ± 5,7	323,8 ± 6,9**	312,2 ± 4,9**
Ganho de peso (%)	44,0 ± 4,3	68,9 ± 4,3**	59,6 ± 2,6**
Ingestão de ração (g)	20,1 ± 2,1	20,4 ± 0,9	20,8 ± 0,6
Útero/CT (mg/cm)	128,4 ± 6,4	190,4 ± 10,5***	28,3 ± 2,7**
Ovários/CT (mg/cm)	37,4 ± 2,0	27,5 ± 2,8*	-
Gastrocnêmio/CT (mg/cm)	406,4 ± 18,4	527,7 ± 19,3***	453,3 ± 13,3
Índice de Adiposidade (%) [‡]	5,32 ± 0,3	3,31 ± 0,3***	4,86 ± 0,2
Estrogênio (pg/mL)	54,3 ± 4,5	30,5 ± 2,8**	32,5 ± 5,4**
Testosterona (ng/mL)	0,21 ± 0,01	2,84 ± 0,2***	0,17 ± 0,02

Valores estão apresentados como média ± EPM. [‡]depósitos de gordura total/peso corporal x 100; ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ vs grupo SHAM; *** $P < 0,01$ vs grupo OVX. ANOVA uma via seguido pelo teste de Fisher, test t não-pareado para o parâmetro ovários/CT. N=8 em cada grupo para parâmetros biométricos/peso de órgãos; N=5 em cada grupo para parâmetros hormonais e índice de adiposidade. CT, comprimento de tibia.

4.2.2 Comparação entre a função vascular do leito mesentérico isolado de fêmeas intactas tratadas com DN e fêmeas OVX

As figuras 20 e 21 e a tabela 7 resumem os dados das curvas dose-resposta à ACh obtidas dos LVMs de fêmeas intactas tratadas com DN e fêmeas OVX em condições basais (ausência de inibidores) ou na presença de inibidores dos fatores vasoativos derivados do endotélio. Os LVMs isolados de ambos os grupos OVX e SHAM+DN exibiram uma alteração na resposta vasodilatadora evocada pela ACh ($F_{(2,21)} = 6,66$, $P < 0,01$, $n=8$), um indicativo de disfunção vascular (Figura 20A). As fêmeas com média mais baixa dos níveis circulante de estradiol mostraram uma atenuação nas respostas de relaxamento (R_{\max} : SHAM+DN: 73,1 ± 2,9; OVX: 67,0 ± 3,0; % relaxamento) quando comparas àquelas do grupo SHAM (R_{\max} : SHAM: 84,0 ± 3,2; % relaxamento; tabela 7). Os efeitos do tratamento com DN e da ovariectomia nas curvas dose-resposta evocadas pela ACh nos LMVs também podem ser observadas na análises de AUC [$F_{(2,21)} = 4,45$, $P < 0,05$, $n=8$]; figura 20B). Nenhuma diferença na sensibilidade da ACh foi observada nos grupos estudados (tab

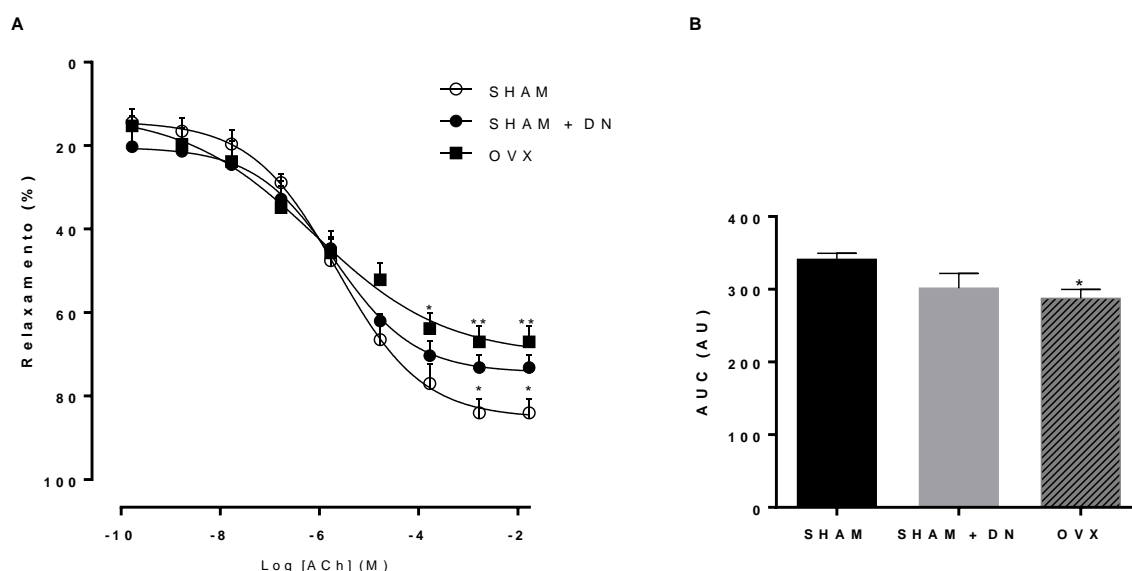


Figura 20. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (○) SHAM, (●) SHAM+DN e (■) OVX na ausência de inibidores farmacológicos. (B) Área abaixo da curva (AUC) dose-resposta à ACh na ausência de inibidores farmacológicos. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. ** $P<0,01$ e * $P<0,05$ vs grupo SHAM. ANOVA de uma ou duas vias seguido de teste de Fisher.

Investigação dos mecanismos envolvidos no prejuízo da reatividade vascular induzida pelo tratamento com DN e ovariectomia (fêmeas com deficiência nos níveis circulantes de estradiol)

A participação dos fatores vasoativos derivados do endotélio nas repostas de relaxamento dos LVMs evocadas pela ACh estão ilustradas na Figura 21 e tabela 7. A deficiência de estrogênio induzida pelo tratamento com DN e pela ovariectomia reduziu a participação do NO nas repostas de relaxamento evocadas pela ACh nos vasos de resistência destas fêmeas. Mais especificamente, nossos resultados mostraram que após a incubação dos LVMs com L-NAME e AG o relaxamento vascular foi significativamente atenuado nos grupos SHAM+DN e OVX. A inibição da NOS pelo L-NAME igualou a reatividade vascular à ACh entre os grupos estudados, indicando que a diferença observada na curva dose-resposta controle (ausência de

inibidores) entre o grupo SHAM e os demais era provavelmente pela via do NO (figura 21B). De fato, a análise da dAUC(%) mostrou que o envolvimento da via do NO no relaxamento dos LVMs foi reduzido em ambos os grupos deficientes de estrogênio (SHAM+DN e OVX) quando comparados ao grupo controle SHAM (figura 21B, inserção; ($F_{(2,21)} = 5,54$, $P < 0,05$, $n=8$) SHAM: $-69,4 \pm 5,1$; SHAM+DN: $-55,5 \pm 3,0^*$; OVX: $-51,7 \pm 3,3^{**}$ %dAUC).

Adicionalmente, o tratamento com AG reduziu o relaxamento induzido pela ACh em ambos os grupos SHAM + DN e OVX, enquanto que a resposta observada na curva controle foi preservada no grupo SHAM (figura 21A; ($F_{(2,21)} = 5,46$, $P < 0,05$, $n=8$). As análises de dAUC(%) apontaram que a modulação endotelial pela iNOS na resposta vasodilatadora à ACh é significativamente maior nos animais com deficiência de estrogênio (figura 21A, inserção; ($F_{(2,21)} = 6,85$, $P < 0,01$, $n=8$) SHAM: $-6,4 \pm 0,9$; SHAM+DN: $-16,8 \pm 3,2^*$; OVX: $-24,4 \pm 5,3^{**}$ %dAUC), sugerindo que a queda dos níveis circulantes deste hormônio pode levar a um processo inflamatório mediado pela iNOS.

Com relação à participação do EDHF (avaliada por meio do bloqueio simultâneo com L-NAME e INDO) e das PGs (avaliada por meio da dAUC (%) na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO) nas respostas vasculares à ACh, nem o tratamento com DN nem a ovariectomia promoveram alterações nestes fatores de relaxamento endotelial. De fato, os grupos SHAM+DN e OVX apresentaram respostas semelhantes àsquelas observadas no grupo SHAM com relação a AUC(%), dAUC (%) e R_{max} tanto na presença de L-NAME quanto na inibição conjunta de L-LAME + INDO (Figura 21C e D, e Tabela 7).

Os valores de R_{max} e pD_2 são mostrados na tabela 7, para uma melhor visualização dos resultados. Em todas as situações estudadas (ausência e presença de inibidores

farmacológicos) não houve diferença entre os grupos experimentais na sensibilidade (pD₂) à ACh.

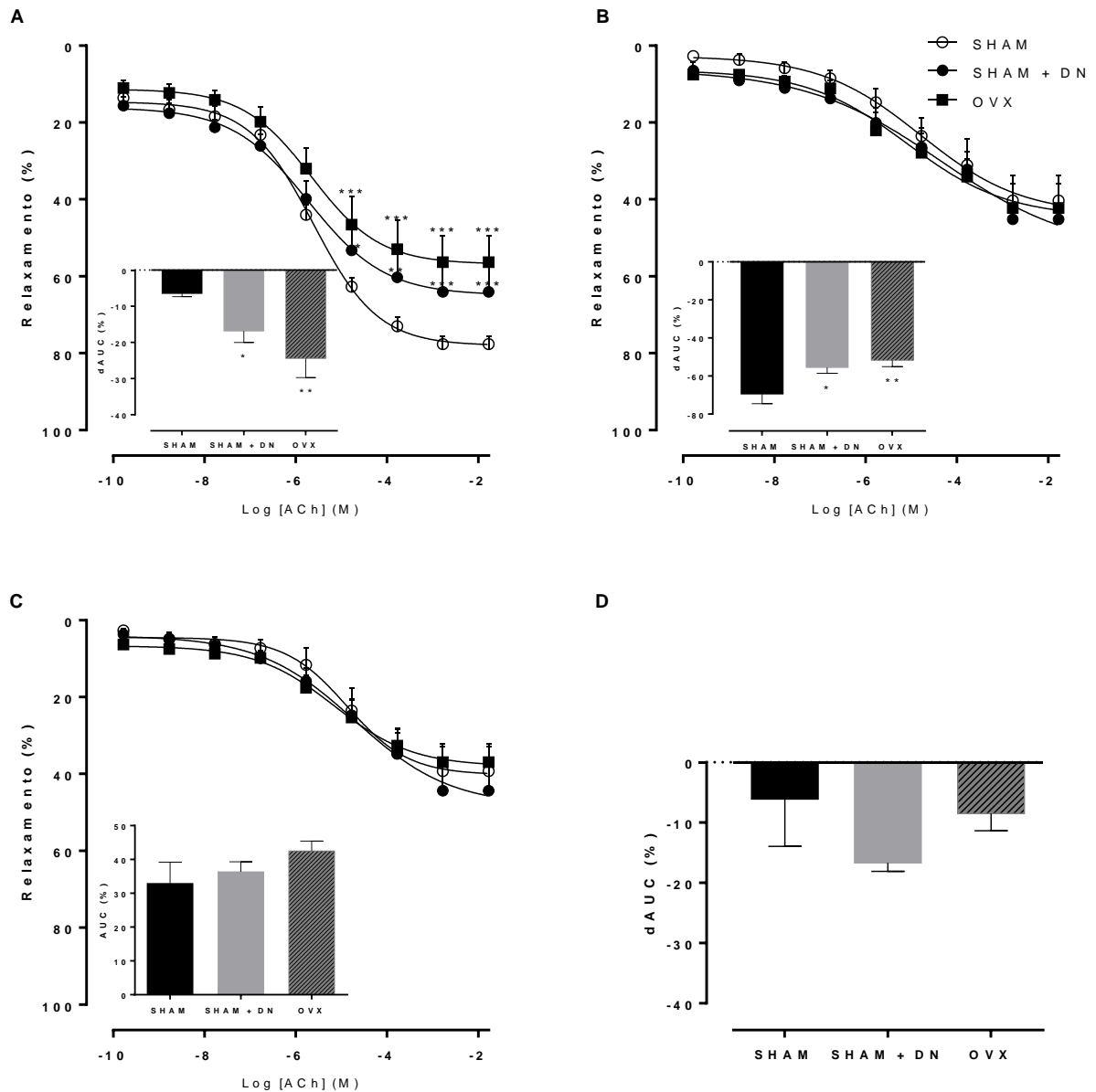


Figura 21. Curvas dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (○) SHAM, (●) SHAM+DN e (■) OVX na presença de (A) AG, (B) L-NAME e (C) L-NAME + INDO. Os gráficos em inserção representam a diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) ou área abaixo da curva (AUC%) dose-resposta a ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com (A) AG, (B) L-NAME e (C) L-NAME + INDO. (D) dAUC% na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média ± EPM, n=8 por grupo. **P<0,01 e *P<0,05 vs grupo SHAM. ANOVA de uma ou duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 7. Valores de resposta máxima (R_{\max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas SHAM, SHAM+DN e OVX na ausência e presença de inibidores farmacológicos.

	Controle		AG		L-NAME		L-NAME + INDO	
	R_{\max}	pD_2	R_{\max}	pD_2	R_{\max}	pD_2	R_{\max}	pD_2
SHAM	84,0±3,2	5,96±0,1	77,6±2,0	5,84±0,1	40,2±6,4	5,23±0,2	39,2±6,2	5,11±0,2
SHAM+ND	73,1±2,9*	6,03±0,1	64,0±5,2*	6,16±0,2	45,1±3,8	5,24±0,2	44,3±7,1	5,13±0,2
OVX	67,0±3,0**	6,43±0,2	53,6±5,6**	5,83±0,2	42,2±6,2	5,44±0,2	36,8±7,9	5,44±0,2

Valores estão apresentados como média ± EPM. R_{\max} : Resposta máxima; pD_2 : -log da concentração da droga para produzir 50% da R_{\max} ; AG, aminoguanidina; L-NAME, N^G-nitro-L-arginina metil éster; INDO, indometacina. Diferença estatística indicada por ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ vs grupo SHAM; ANOVA de uma via seguido de teste de Fisher. N=8/grupo

4.3 ESTUDO 3: EFEITOS DO TRATAMENTO COM DN EM FÊMEAS OVARIETOMIZADAS SEDENTÁRIAS OU TREINADAS

Neste terceiro conjunto de experimentos investigamos se fêmeas com deficiência dos hormônios sexuais femininos (ovarietomizadas) apresentariam efeito deletério aditivo sobre o perfil de reatividade vascular quando tratadas com DN.

4.3.1 Características biométricas e hormonais

Na tabela 8 estão resumidos os valores do peso corporal, ingestão de ração, valores de peso dos órgãos e concentrações sanguíneas de estradiol e testosterona dos animais avaliados no estudo 3. Nas fêmeas ovariectomizadas o tratamento com DN e/ou o treinamento físico não promoveram alterações no peso corporal ao final do protocolo experimental ou sobre o ganho de peso das fêmeas. Adicionalmente, não foram observadas diferenças na ingestão diária de ração entre os grupos. Com relação ao peso do útero e músculo gastrocnêmio, somente a variável tratamento,

mas não o treinamento físico ou a interação entre os dois fatores foi identificada como fonte de variação estatisticamente significativa. Mais especificamente, quando as fêmeas tratadas com VEH (OVEH + SED e OVEH + EXC) foram comparadas às fêmeas tratadas com DN (ODN + SED e ODN + EXC) observou-se maior peso de útero ($F_{(1,28)} = 399,4$, $P < 0,001$, $n=8$) e maior peso do músculo gastrocnêmio ($F_{(1,28)} = 14,96$, $P < 0,001$, $n=8$) (ambos expressos como valores normalizados pelo comprimento da tíbia) nas fêmeas que receberam o tratamento com o EAA.

A análise do nível sérico de estradiol mostrou resultados similares entre as fêmeas sedentárias ou treinadas tratadas ou não com DN. De maneira semelhante, todos os grupos estudados apresentaram perfil similar de ciclo estral durante o monitoramento citológico (todas as fêmeas ovariectomizadas permaneceram na fase diestro). Em contrapartida, os níveis de testosterona estavam elevados nas fêmeas ODN + SED e ODN + EX ($F_{(1,15)} = 150,5$, $P < 0,001$ para tratamento, $n=5$), com o treinamento físico associado ao tratamento promovendo uma redução destes níveis ($F_{(1,15)} = 6,73$, $P < 0,05$ para interação, $n=5$).

O treinamento físico foi analisado por meio da avaliação dos níveis de lactato sanguíneo após o final de cada sessão de saltos em água. Não foram observadas diferenças nas concentrações de lactato entre os grupos EXC (OVEH + EXC: $10,38 \pm 1,07$; ODN + EXC: $9,96 \pm 1,16$ mmol/L; $t_{(14)}=0,26$, $P=0,79$, $n=8$) mas em ambos os grupos o limiar anaeróbico foi atingido (*i.e.* lactato sanguíneo $>7,0$ mmol/L).

Tabela 8. Características biométricas e níveis hormonais dos grupos ovariectomizados veículo sedentário (OVEH + SED), Decanoato de Nandrolona (DN)-sedentário (ODN + SED), veículo treinado (OVEH + EXC) e DN treinado (ODN + EXC).

	OVEH + SED	ODN + SED	OVEH + EXC	ODN + EXC
Peso corporal inicial (g)	206,0 ± 3,5	200,0 ± 5,1	201,0 ± 4,9	199,5 ± 4,4
Peso corporal final (g)	310,2 ± 5,4	318,2 ± 3,7	301,2 ± 5,3	311,5 ± 6,4
Ganho de peso (%)	50,9 ± 3,8	59,8 ± 4,3	50,7 ± 5,7	56,8 ± 5,5
Ingestão de ração (g)	21,3 ± 0,4	20,8 ± 0,6	19,8 ± 0,7	20,1 ± 0,6
Útero/CT (mg/cm)	28,3 ± 2,7	145,5 ± 9,0***	27,9 ± 1,5	149,6 ± 7,1***
Gastrocnêmio/CT (mg/cm)	453,2 ± 13,3	516,5 ± 13,1***	448,3 ± 14,6	484,5 ± 10,0 [#]
Estrogênio (pg/mL)	43,5 ± 5,4	39,3 ± 4,4	31,9 ± 2,3	34,5 ± 8,9
Testosterona (ng/mL)	0,17 ± 0,02	2,25 ± 0,22***	0,27 ± 0,08	1,62 ± 0,12*** ^{\$\$}

Valores estão apresentados como média ± EPM. ** $P < 0,01$ vs grupo OVEH + SED; *** $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ vs grupo OVEH + EXC; \$\$\$ $P < 0,01$ vs grupo ODN + SED (ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher). N=8 em cada grupo para parâmetros biométricos/peso de órgãos; N=5 em cada grupo para parâmetros hormonais. CT, comprimento de tíbia.

4.3.2 Efeitos do tratamento com DN sobre a função vascular do leito mesentérico isolado

Semelhante ao observado nos estudos 1 e 2, a pressão de perfusão dos LVMs não foi alterada em nenhum dos grupos estudados (basal: OVEH+SED: 31,5±0,8; ODN+SED: 32,1±1,3; OVEH+EXC: 31,4±1,8; ODN+EXC: 32,0±2,4; mmHg, n=8; após aumento do tônus vascular com NE: OVEH+SED: 118,3±4,9; ODN+SED: 117,9±5,4; OVEH+EXC: 115,4±6,6; ODN+EXC: 113,2±6,1; mmHg, n=8). No entanto, de forma contrária ao observado nos experimentos anteriores, o tratamento com DN não alterou a reatividade vascular dos LVMs das ratas ovariectomizadas sedentárias ou treinadas. Também não foram observadas diferenças entre as curvas dose-resposta à ACh, AUC ou pD₂ entre as fêmeas treinadas quando comparadas às fêmeas dos demais grupos (figura 22 e tabela 9).

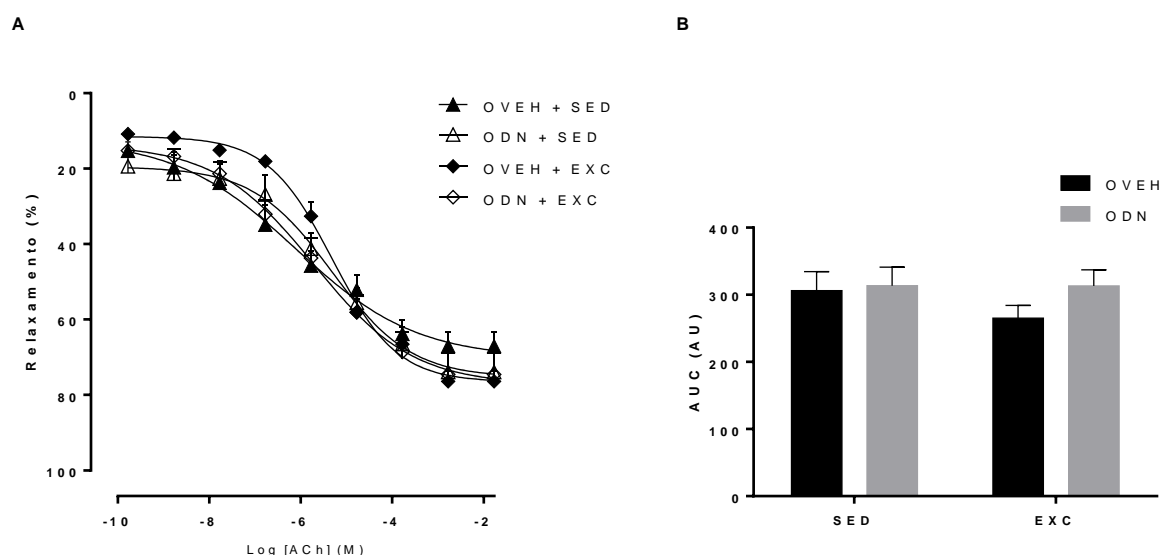


Figura 22. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (\blacktriangle) OVEH + SED, (\triangle) ODN + SED, (\blacklozenge) OVEH + EXC e (\lozenge) ODN + EXC na ausência de inibidores farmacológicos. (B) Área abaixo da curva (AUC) dose-resposta à ACh na ausência de inibidores farmacológicos. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 9. Valores de resposta máxima (R_{max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias (OSED) ou treinadas (OEXC) tratadas com decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na ausência de inibidores.

	R_{max} (%)	pD_2	AUC (AU)
OVEH + SED	67,0 \pm 3,7	6,10 \pm 0,4	306,0 \pm 28,5
ODN + SED	73,8 \pm 1,1	5,31 \pm 0,2	313,4 \pm 27,9
OVEH + EXC	76,3 \pm 2,7	5,30 \pm 0,1	265,3 \pm 18,9
ODN + EXC	74,5 \pm 5,7	5,70 \pm 0,3	313,3 \pm 23,6

Valores estão apresentados como média \pm EPM. R_{max} : Resposta máxima; pD_2 : -log da concentração da droga para produzir 50% da R_{max} ; ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. $N=8$ /grupo

Avaliação dos principais fatores de relaxamento endotelial envolvidos nas respostas vasodilatadoras induzidas pela ACh em fêmeas ovariectomizadas sedentárias e treinadas tratadas com DN.

Muito embora o tratamento com DN não tenha causado prejuízo adicional sobre a reatividade vascular das fêmeas ovariectomizadas (as quais apresentam disfunção vascular quando comparadas a animais sem deficiência de estrogênio, como demonstrado nos resultados do estudo 2), avaliamos se os principais fatores de relaxamento endotelial estariam alterados após o tratamento crônico com o EAA. Para tanto, examinamos as repostas vasodilatadoras induzidas pela ACh na presença de inibidores específicos.

4.3.2.1 Avaliação da participação do NO na resposta de relaxamento dependente do endotélio

Efeito da inibição da NOS

Em todos os grupos o L-NAME diminuiu acentuadamente o relaxamento induzido pela ACh (Figura 23A), entretanto mesmo após o bloqueio da NOS as respostas observadas nos animais do grupo ND (ODN+SED e ODN+EXC) permaneceram inalteradas quando comparadas as respostas dos grupos OVEH. A participação do NO nas respostas de relaxamento à ACh também foi acessada por meio da dAUC(%) antes e após a presença de L-NAME (figura 23B e tabela 10), indicando não haver diferenças entre as fêmeas estudadas. Ademais, as análises de R_{max} e pD_2 após o bloqueio com L-NAME foram semelhantes entre os grupos. Conjuntamente, estes

dados indicam que nem o tratamento com DN ou o treinamento físico foram capazes de alterar o envolvimento do componente NO sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio nas fêmeas OVX.

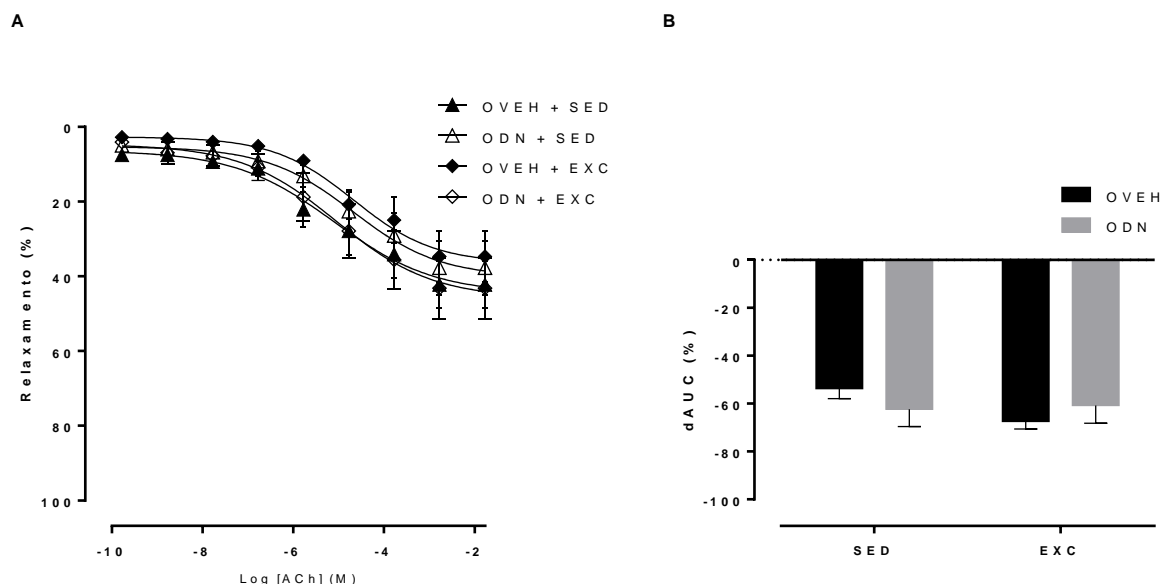


Figura 23. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (\blacktriangle) OVEH + SED, (\triangle) ODN + SED, (\blacklozenge) OVEH + EXC e (\diamond) ODN + EXC na presença de L-NAME. (B) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 10. Valores de resposta máxima (R_{\max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias (OSD) ou treinadas (OEXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME.

	R_{\max} (%)	pD_2	dAUC (%)
OVEH + SED	42,2 \pm 6,2	5,18 \pm 0,3	-53,7 \pm 4,1
ODN + SED	37,6 \pm 7,0	4,89 \pm 0,2	-62,3 \pm 7,2
OVEH + EXC	34,6 \pm 6,7	4,79 \pm 0,2	-67,4 \pm 3,1
ODN + EXC	43,1 \pm 8,0	5,28 \pm 0,3	-60,7 \pm 7,3

Valores estão apresentados como média \pm EPM. R_{\max} : Resposta máxima; pD_2 : -log da concentração da droga para produzir 50% da R_{\max} ; ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. $N=8$ /grupo

4.3.2.2 Avaliação da participação do EDHF e dos PGs na resposta de relaxamento dependente do endotélio

Efeito da inibição da NOS e PGs – avaliação da participação do EDHF

Similarmente aos resultados observados após o bloqueio dos LVMs com L-NAME, a incubação simultânea com L-NAME e INDO também promoveu uma nítida redução do relaxamento vascular induzida pela ACh em todos os grupos estudados. Por outro lado, quando comparados entre si, os grupos OVEH e ODN não apresentaram diferenças entre as curvas dose-resposta à ACh, R_{\max} , pD_2 ou AUC(%) (figura 24 e tabela 11). Estes resultados não dão suporte a uma participação diferencial do EDHF sobre o relaxamento endotelial dos LVMs das fêmeas ovariectomizadas tratadas com VEH ou com DN.

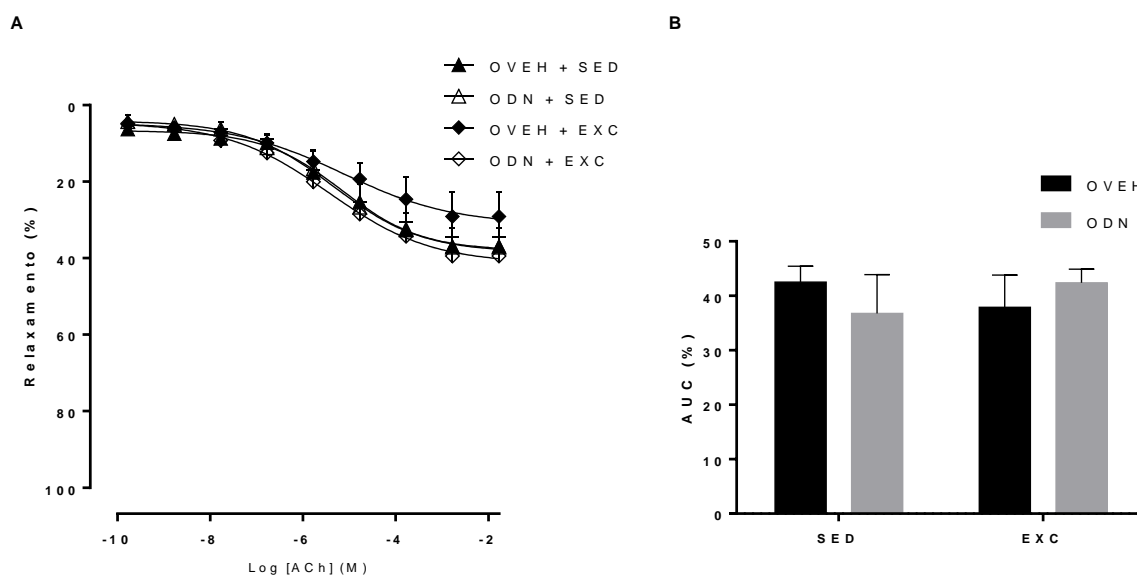


Figura 24. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs dos grupos (\blacktriangle) OVEH + SED, (\triangle) ODN + SED, (\blacklozenge) OVEH + EXC e (\lozenge) ODN + EXC na presença de L-NAME + INDO. (B) Área abaixo da curva (AUC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME + INDO. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

Tabela 11. Valores de resposta máxima (R_{\max}) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias (OSED) ou treinadas (OEXC) tratadas com Decanoato de Nandrolona (DN) ou veículo (VEH) na presença de L-NAME + INDO.

	R_{\max} (%)	pD_2	AUC (%)
OVEH + SED	36,8±4,8	5,26 ±0,2	42,5 ± 2,9
ODN + SED	37,1±8,4	5,42 ±0,3	36,7 ±7,1
OVEH + EXC	29,0±6,4	5,33 ±0,3	37,8 ±5,9
ODN + EXC	39,4±4,9	5,57 ±0,2	42,4 ±2,5

Valores estão apresentados como média ± EPM. R_{\max} : Resposta máxima; pD_2 : -log da concentração da droga para produzir 50% da R_{\max} ; ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher. N=8/grupo

Efeito da inibição dos PGs

O bloqueio farmacológico dos LVMs com INDO não promoveu nenhuma alteração nas respostas de relaxamento induzidas pela ACh nas fêmeas ovariectomizadas tratadas com DN ou nas submetidas ao treinamento físico. De fato, as curvas dose-resposta à ACh, que eram iguais em presença de L-NAME, permaneceram iguais após a adição de INDO juntamente ao L-NAME em todos os grupos estudados (figuras 23 e 24). Adicionalmente, não houve mudança, em nenhum grupo, nos valores de $dAUC(\%)$ na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO (OVEH+SED: $-6.1 \pm 3,9$; ODN+SED: $3.1 \pm 8,5$; OVEH+EXC: $5,2 \pm 11,3$; ODN+EXC: $5,6 \pm 9,2$ % $dAUC$, n=8; figura 25), sugerindo que a participação dos derivados da via do ácido araquidônico-COX nas respostas de relaxamento não são alteradas pelo DN ou pelo treinamento físico em ratas ovariectomizadas.

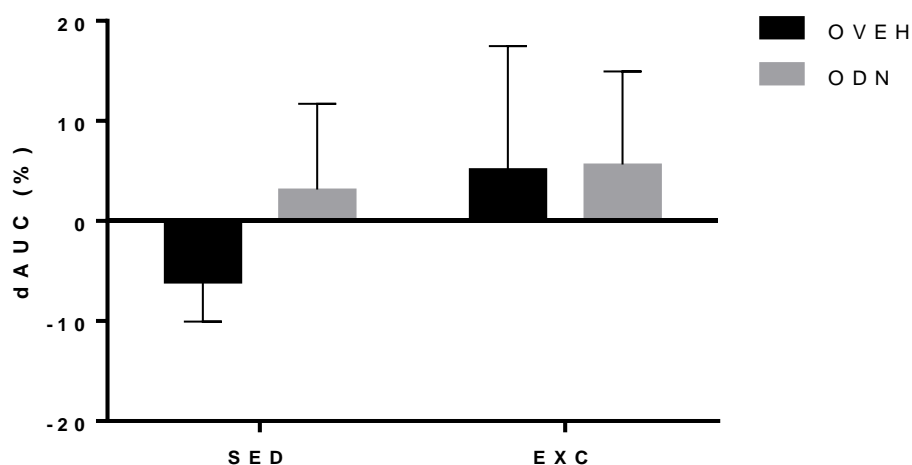


Figura 25. Diferença percentual na área abaixo da curva na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO entre os grupos OVEH + SED, ODN + SED, OVEH + EXC e ODN + EXC. Esses dados dão informação sobre a magnitude da participação da via da COX no relaxamento à ACh. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

4.3.3 Efeitos do tratamento com DN sobre a intensidade das bandas proteicas da NOS, Akt e NADPH oxidase nos LVMs de fêmeas ovariectomizadas sedentárias ou treinadas

Apesar de o tratamento com DN ou a interação deste com o treinamento físico não ter contribuído para o surgimento de alterações aditivas na disfunção vascular observada em fêmeas ovariectomizadas, avaliamos se esses fatores (tratamento com DN ou treinamento físico) poderiam propiciar a modificação da intensidade das bandas de proteínas envolvidas na regulação da homeostase do vaso. Análises de western blot nos ramos mesentéricos de ratas ovariectomizadas apontaram que o tratamento com DN ($F_{(1,17)} = 4,64$, $P < 0,05$, $n=5$) impeliu uma redução na razão da peNOS/eNOS (figura 26A). Adicionalmente, a interação entre o tratamento com DN e o treinamento físico reduziu a fosforilação da Akt ($F_{(1,18)} = 4,43$, $P < 0,05$, $n=5-6$), sendo que a fosforilação desta proteína em ratas com deficiência de estrogênio também foi

reduzida pelo treinamento físico ($F_{(1,18)} = 6,71$, $P < 0,05$, $n=5-6$; figura 26C). A intensidade das bandas das outras proteínas investigadas (iNOS e NADPH oxidase, subunidade gp91^{phox}) permaneceram similares entre as fêmeas dos grupos OVEH e ODN (figura 26B e D).

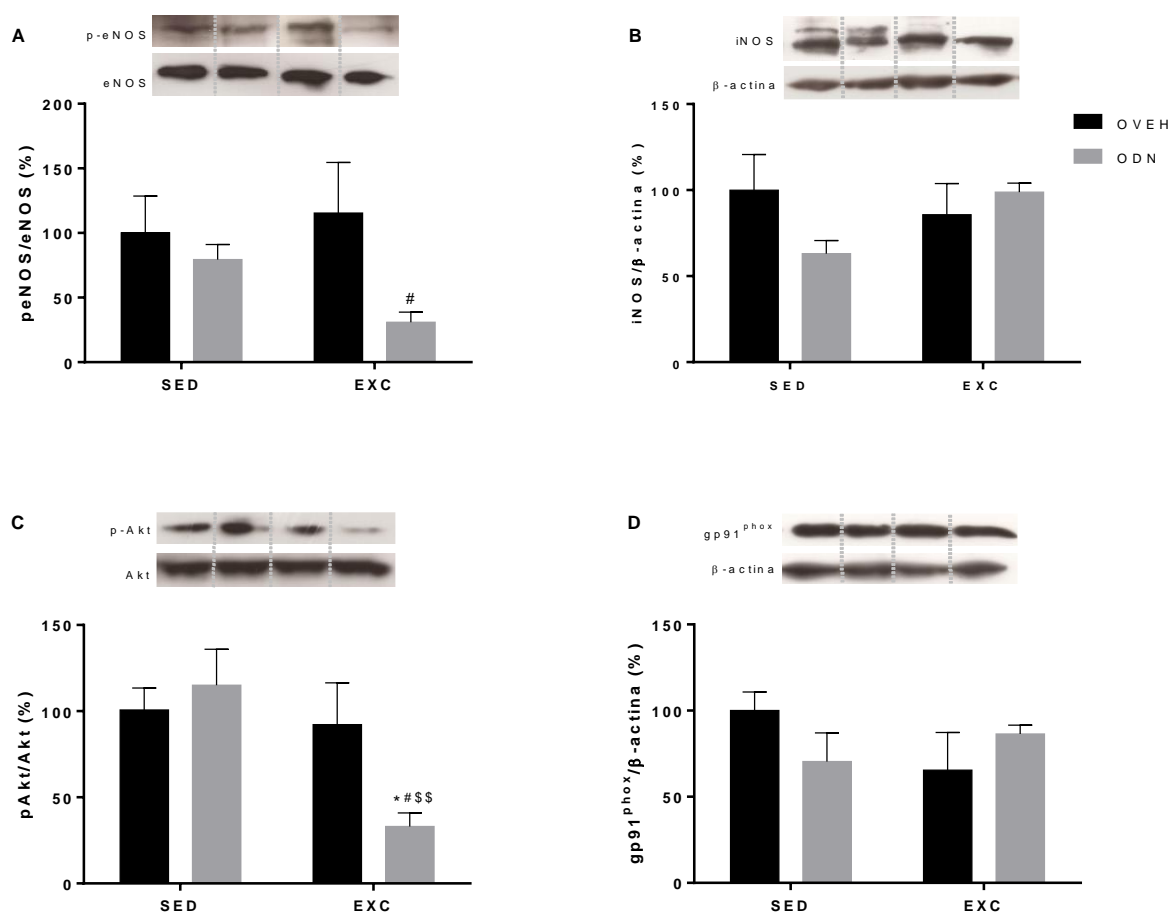


Figura 26. Resultados da intensidade das bandas proteicas das isoformas endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) do óxido nítrico sintase, proteína quinase B (Akt) e NADPH oxidase (gp91^{phox}) nos ramos mesentéricos nos grupos OVEH + SED, ODN + SED, OVEH + EXC e ODN + EXC. Na parte superior da figura estão as bandas representativas das respectivas proteínas. Dados estão expressos como média ± EPM, $n=5$ por grupo. $*P < 0,05$ vs grupo OVEH + SED; $^{\#}P < 0,05$ vs grupo OVEH + EXC; $^{\$}P < 0,05$ vs grupo ODN + SED. ANOVA de duas vias seguido de teste de Fisher.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo apontam que a exposição à doses supra terapêuticas de DN altera a função endotelial em vasos de resistência tanto em fêmeas sedentárias quanto em fêmeas submetidas ao treinamento físico. Nossos principais achados mostram que o tratamento com DN (I) prejudicou a reatividade vascular através de mecanismos dependentes do endotélio, provavelmente envolvendo a via do NO; (II) induziu alterações na intensidade de bandas proteicas, cujos produtos enzimáticos modulam o tônus vascular; (III) contribuiu para modificações funcionais nos LVMs de fêmeas intactas semelhantes às observadas em fêmeas ovariectomizadas não-tratadas com DN; (IV) promoveu alterações fisiológicas e vasculares que não foram restauradas pelo treinamento físico e; (V) não causou prejuízo adicional na reatividade vascular instaurada pelo estado de deficiência de estrogênio, tampouco modificou os principais fatores endoteliais que contribuem para a resposta de relaxamento em fêmeas ovariectomizadas. Nosso estudo fornece novos dados que ajudam a elucidar o papel modulador dos EAAs sobre a função endotelial em fêmeas submetidas a tratamento com doses supra terapêuticas.

A natureza anaeróbica do protocolo de treinamento de contra-resistência utilizado neste estudo foi escolhida visando uma abordagem translacional, de modo a reproduzir exercícios de ganho de força comumente utilizados tanto por homens quanto por mulheres usuários de EAAs (GOLDFIELD, 2009; BARCELOUX; PALMER, 2013). A redução no índice de adiposidade observada nas fêmeas submetidas ao treinamento físico (grupos EXC) corrobora os contundentes efeitos benéficos do treinamento físico contra resistência sobre a composição corporal e sobre o sistema

musculoesquelético descritos na literatura (POLLOCK et al., 2000; WILLIAMS et al., 2007). No entanto, nossos achados indicam que o treinamento de contra-resistência não produziu uma resposta vascular adaptativa nos LVMs, nem preveniu e/ou reverteu as alterações vasculares induzidas pelo tratamento com DN em ambas fêmeas intactas e ovariectomizadas.

Trabalhos previamente publicados avaliando os efeitos favoráveis do exercício contra-resistência sobre a estrutura e função do sistema vascular são controversos, sendo as disparidades encontradas na literatura atribuídas tanto a fatores como tipo, duração e intensidade do exercício, bem como idade, sexo e raça (UMPIERRE; STEIN, 2007; PADILLA et al., 2011; MIYACHI, 2012; RAMOS et al., 2015). De fato, exercícios de resistência são apontados como instrumentos capazes de melhorar, prejudicar ou não afetar a função endotelial/vascular (CLARKSON et al., 1999; MIYACHI et al., 2004; KAWANO et al., 2008; MAIORANA et al., 2011; MOTA et al., 2014). Em revisão realizada por Umpierre e Stein (2007), o exercício de contra-resistência recebe destaque como potencialmente benéfico no controle dos níveis pressóricos e por não afetar a estabilidade hemodinâmica. Entretanto, a distensibilidade arterial, a função vascular e o fluxo sanguíneo periférico frente ao treinamento contra-resistência ainda são apontados como alvo para pesquisas adicionais.

Apesar de alguns estudos não descreverem alterações na função vascular de roedores machos expostos ao DN (CUNHA et al., 2005; FRANQUNI et al., 2013), nossos dados corroboram outros estudos clínicos e experimentais que sugerem que doses supra terapêuticas de EAAs contribuem para o prejuízo da reatividade vascular tanto em vasos de condutância, quanto de resistência oriundos de indivíduos do sexo masculino (FERRER et al., 1994; LANE et al., 2006; SUN et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que o tratamento com DN (em regime de

tratamento similar ao utilizado nos experimentos conduzidos no presente trabalho) causou o desenvolvimento de hipertensão sem o comprometimento da reatividade vascular em ratos Wistar machos (FRANQUNI et al., 2013). Entretanto, ao avaliarmos recentemente os efeitos do tratamento com DN sobre parâmetros cardiovasculares de fêmeas, observamos que a pressão arterial, a frequência cardíaca e o reflexo cardiovascular Bezold-Jarish não foram alterados pelo tratamento com o EAA, enquanto que parâmetros hemodinâmicos (pressão sistólica do ventrículo esquerdo, a dP/dt positiva e negativa) e morfométricos do tecido cardíaco estavam comprometidos (BRASIL et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016). Somando-se a estes resultados, os dados deste trabalho indicam que o DN alterou a vasodilatação dependente do endotélio nos LVMs de ratas fêmeas intactas sedentárias e treinadas, sugerindo que os danos vasculares induzidos pelos EAAs podem ser sexo-específicos. Tal fato evidencia que a diferença entre o meio hormonal de machos e fêmeas pode resultar em consequências cardiovasculares distintas para usuários de EAAs.

Embora não possamos apontar se os efeitos vasculares negativos observados nas fêmeas tratadas com DN são devido a uma ação direta do DN ou indireta do tratamento com o EAA sobre os níveis circulantes de testosterona, os nossos dados sugerem que a redução dos níveis séricos de estradiol nas fêmeas tratadas com DN também pode contribuir para o prejuízo da reatividade vascular. De fato, nossos dados corroboram estudos anteriores mostrando o aumento dos níveis de testosterona e de redução dos níveis de 17- β estradiol tanto em mulheres quanto em roedores fêmeas sob regime de tratamento com EAAs (MALARKEY et al., 1991; LEWIS et al., 2002; ELIAKIM et al., 2011; BORDBAR et al., 2014; BRASIL et al., 2015). Diversas pesquisas avaliando os efeitos e mecanismos de ação da testosterona sobre o SCV

se mostram inconclusivas e são frequentemente controversas, sendo este hormônio associado tanto a efeitos negativos quanto positivos (LIU; DEATH; HANDELSMAN, 2003; ILIESCU; RECKELHOFF, 2006). Em contrapartida, a relevância do estado de deficiência estrogênica sobre o SCV é bem reconhecida e possui implicações no desenvolvimento de várias alterações vasculares tanto em animais como em humanos (XING et al., 2009; KNOWLTON; LEE, 2012).

O possível mecanismo pelo qual os andrógenos sintéticos podem levar a uma redução dos níveis de estrogênio é através da ativação de um ciclo de retroalimentação negativa tanto do hormônio FSH como do LH, como demonstrado por Bordbar e cols (2014). Além disso, o tratamento com DN resultou em hipotrofia ovariana em fêmeas intactas, o que também pode estar relacionado à redução dos níveis séricos de estradiol e a interrupção do ciclo estral das ratas, amplamente relatado por outros (GEREZ; FREI; CAMARGO, 2005; DE ALMEIDA CHUFFA et al., 2011; BELARDIN et al., 2014). Interessantemente, nossos dados mostram que a persistência do ciclo estral na fase diestro, assim como o aumento no peso corporal encontrado nas fêmeas intactas tratadas com DN, são similares às alterações encontradas em fêmeas com deficiência de estrogênio causada pelo procedimento de ovariectomia. Muito embora não seja possível excluir a participação direta do DN nas alterações observadas, é tentador inferir que tais efeitos sejam oriundos da deficiência de estrogênio e não devido a um aumento dos andrógenos circulantes. Neste sentido, nossos dados indicam que a deficiência de estrogênio parece ser o denominador comum entre as alterações supracitadas.

A literatura acerca dos efeitos do DN bem como de outros andrógenos sobre o sistema reprodutor feminino é vasta, senão o principal alvo de estudos experimentais avaliando os EAAs no sexo feminino. Nossos dados de aumento do peso do útero,

redução do peso dos ovários e até mesmo de ganho o peso corporal observados em fêmeas tratadas com DN corroboram estudos anteriores que demonstraram que o tratamento com DN é capaz de promover ações antiestrogênicas (DE VISSER; OVERBEEK, 1960; GEREZ; FREI; CAMARGO, 2005; MOBINI FAR et al., 2007). Ainda sobre os efeitos do DN sobre o peso de órgãos, tanto as fêmeas intactas quanto ovariectomizadas apresentaram aumento da relação do peso do gastrocnêmio/tíbia, enquanto as fêmeas intactas também mostraram redução do índice de adiposidade. Em conjunto, esses resultados demonstram a eficiência anabólica do tratamento utilizado e confirmam o uso de EAAs com objetivo de melhora do balanço de nitrogênio, aumento do conteúdo muscular e/ou prevenção da perda de massa magra bem como redução da massa gorda (WU, 1997; HARTGENS; KUIPERS, 2004; KICMAN, 2008).

Dentre os resultados do nosso estudo provavelmente o mais esclarecedor, foi a demonstração da redução da vasodilatação mediada pelo NO nas fêmeas intactas tratadas com DN quando comparado aos animais VEH. Esse achado sugere comprometimento da função endotelial da via do NO em um leito vascular que contribui substancialmente para a resistência vascular periférica (CHRISTENSEN; MULVANY, 1993). Sob as nossas condições experimentais, o inibidor da NOS L-NAME atenuou acentuadamente o relaxamento vascular em todos os grupos. Contudo, a magnitude do efeito do L-NAME (% dAUC) foi menor em ambos os grupos ND+SED e ND+EXC, indicando uma redução na atividade da via NO nos grupos tratados com o EAA. Resultados semelhantes foram descritos por Chinnathambi e cols. (2014, 2013), que relataram que ratas grávidas com exposição pré-natal à altas doses de testosterona tinham o componente NO de relaxamento à ACh comprometido tanto em artérias mesentéricas quanto em uterinas. Adicionalmente, os mesmos

autores mostraram em trabalho subsequente que o tratamento de fêmeas gestantes com altas doses de testosterona afetou a função cardiovascular da prole na idade adulta, levando ao aumento da pressão arterial e diminuição do relaxamento vascular em ambos os sexos. Entretanto, as alterações nos fatores de relaxamento dependente do endotélio se mostraram sexo-específicas, com prejuízo do componente EDHF em machos e do NO em fêmeas (CHINNATHAMBI; YALLAMPALLI; SATHISHKUMAR, 2013).

Interessantemente, as alterações na via do NO induzidas pelo tratamento de fêmeas intactas com DN são semelhantes às aquelas observadas nos LVMs de ratas OVX. Além das respostas semelhantes de relaxamento à ACh identificadas nos grupos OVX e SHAM + ND, também observamos que a magnitude do efeito de L-NAME (% dAUC) foi menor nestes grupos com deficiência de estrogênio em comparação com as fêmeas SHAM. A redução dos níveis de estradiol é bem relacionada ao prejuízo de reatividade vascular tanto sobre agentes vasoconstritores como vasodilatadores, como demonstrado em diversos trabalhos utilizando-se o modelo animal de ovariectomia (PINNA et al., 2006; PEREZ-TORRES et al., 2008; CAMPOREZ et al., 2011; SHUTO et al., 2011). A disfunção endotelial resultante de privação estrogênica é frequentemente relacionada a alterações na síntese/liberação dos fatores de relaxamento (ARENAS et al., 2005; NAWATE et al., 2005), aumento na produção de substâncias vasoconstritoras (como endotelina, tromboxano A₂, prostaglandina H) (DAVIDGE; ZHANG, 1998), ativação do sistema renina-angiotensina (YUNG et al., 2011) e aumento do estado oxidativo (WASSMANN et al., 2001; SU; YANG; CHEN, 2007). Todos os quadros de alterações mencionados acima, quer seja em conjunto ou individualmente, estão intimamente ligados ao desenvolvimento de DCV em mulheres na pós-menopausa.

A biodisponibilidade reduzida do NO como principal causa de disfunção endotelial em ratas ovariectomizadas foi previamente descrita por nosso grupo de pesquisa (CALIMAN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; LAMAS et al., 2015) bem como por outros (WONG et al., 2006; LEBLANC et al., 2009), ambos os casos destacando a interação modulatória entre o 17- β -estradiol e o NO. Mais especificamente, Caliman e cols. (2013), Lamas e cols. (2015) e Oliveira e cols. (2014) discorrem que a redução no relaxamento induzido pela ACh em LVMs isolados de ratas Wistar após cinco semanas de ovariectomia é provavelmente resultante de alterações na via do NO. Outro estudo realizado por LeBlanc e cols. (2009) apontou um prejuízo na dilatação induzida por fluxo em arteríolas coronárias de fêmeas ovariectomizadas idosas (22 meses), bem como uma redução da resposta relaxante após o bloqueio com L-NAME; Os autores desse trabalho ainda observaram que o tratamento do grupo ovariectomizado com 17 β -estradiol foi capaz de reverter o menor relaxamento das arteríolas coronárias. Por fim, Wong e cols. (2006) mostraram um aumento na contratilidade em anéis de aorta em fêmeas ovariectomizadas comparado aos animais controle, cuja diferença foi aumentada após a utilização de L-NAME como instrumento farmacológico.

Levando em consideração os dados anteriores e a fim de explorar a conexão entre as alterações funcionais do endotélio mediadas pelo tratamento com DN e os níveis de estrogênio e testosterona, nós avaliamos a reatividade dos LVMs isolados de ratas ovariectomizadas tratadas com o EAA. Apesar de os animais ovariectomizados apresentarem prejuízo na vasodilatação induzida pela ACh quando comparados aos animais sem deficiência de estrogênio, o tratamento com DN não causou prejuízo adicional sobre a reatividade vascular de fêmeas ovariectomizadas (grupo ODN) quando comparadas àquelas do grupo veiculo (OVEH), tampouco levou a alterações

aditivas no componente NO. Deste modo, nossos dados sugerem que a deficiência de estrogênio pode ser um fator importante na mediação da disfunção vascular em fêmeas tratadas com DN em detrimento aos níveis elevados de testosterona.

Apesar de pouco explorado no sexo feminino, a redução da biodisponibilidade do NO devido ao uso de EAAs e altas doses de testosterona em machos já foi alvo de pesquisa em diversos estudos anteriores. No trabalho publicado por Sun e cols. (2013), utilizando dose semelhante ao do presente estudo (20 mg/kg), os autores observaram a redução da vasodilatação mediada pelo NO em anéis de aorta isolados de ratos machos tratados com Nandrolona. De maneira similar, Ros,ca e cols. (2016) descreveram recentemente uma redução nos níveis plasmáticos de NO (soma de nitrito e nitrato totais, produtos de oxidação estáveis do metabolismo do NO) em ratos machos adultos tratados com DN por 12 semanas. Estas reduções de NO também foram observadas clinicamente em um estudo que verificou que voluntários saudáveis recebendo doses supra fisiológicas de testosterona tiveram seu conteúdo urinário de NO (nitrito e nitrato totais) reduzidos (SKOGASTIERNA et al., 2014). Embora não possamos afirmar que as alterações na função vascular de machos tratados com EAAs sejam devido a alterações nos níveis de andrógenos circulantes ao invés de alterações nos níveis de estradiol (ausência de dados na literatura), é tentador especular que os mecanismos pelos quais o DN atua causando alterações vasculares em machos e fêmeas possam ser sexo-específicos.

O mecanismo pelo qual observamos uma redução nos níveis de NO em ratas tratadas com DN parece estar associado com a fosforilação de duas enzimas de notória importância na via do NO, a eNOS e Akt. Mais especificamente, nós observamos que o comprometimento da reatividade vascular induzido pelo DN nos LVMs foi acompanhado por uma diminuição da fosforilação de eNOS (Ser¹¹⁷⁷) e Akt (Ser⁴⁷³)

nos ramos mesentéricos tanto de fêmeas intactas sedentárias e treinadas, bem como de fêmeas ovariectomizadas treinadas, sugerindo uma redução das formas ativas da eNOS e Akt nesses grupos. O sítio de fosforilação Ser¹¹⁷⁷ da eNOS é o principal regulador da produção de NO na vasculatura sistêmica (DIMMELER et al., 1999) e é regulado pela via PI3K/Akt, entre outros. A capacidade da nandrolona em modular a via da Akt em diferentes tecidos já foi descrita anteriormente (WHITE et al., 2009; PENNA et al., 2011; SIRIANNI et al., 2012), mas ao nosso conhecimento, este estudo mostra pela primeira vez que doses supra terapêuticas de DN são capazes de reduzir a ativação de Akt na vasculatura e, provavelmente, a ativação da eNOS, contribuindo para a diminuição da formação de NO.

Ainda sobre andrógenos e Akt-eNOS, trabalhos previamente publicados apontam para uma modulação positiva entre testosterona, ativação de Akt e eNOS no tecido muscular e cultura de células endoteliais. Tais estudos mostraram que a testosterona, em doses que mimetizam a terapia de reposição com este hormônio, aumentam a fosforilação da Akt no tecido cardíaco de ratos machos castrados (CHODARI et al., 2016) e no tecido muscular esquelético de homens portadores de HIV (KONCAREVIC et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados em cultura de células, nas quais o tratamento agudo com testosterona aumentou a fosforilação da Akt em mioblastos (BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013) e em células endoteliais de aorta humana (YU et al., 2010, 2012), sendo que nestes últimos trabalhos Yu e cols. observaram aumento da ativação da eNOS concomitante ao aumento da fosforilação da Akt. Tais dados vão de encontro aos resultados observados por nós em fêmeas tratadas com DN, entretanto vale ressaltar que os trabalhos supracitados utilizaram doses de testosterona inferiores às utilizadas objetivando aumento de massa muscular. Mais importante, os mecanismos de ação da testosterona não compartilham

necessariamente os mesmos mecanismos intracelulares do DN, o que, por si só, pode justificar a disparidade entre os resultados.

É importante ressaltar que não podemos excluir a possibilidade das reduções na fosforilação de eNOS (Ser¹¹⁷⁷) e Akt (Ser⁴⁷³) serem um efeito indireto do DN em decorrência da redução dos níveis de estrogênio. Isso pode ser explicado pelo fato do tratamento de ratas fêmeas intactas com DN diminuir os níveis circulantes de 17 β -estradiol. Como este hormônio é conhecido por estimular a fosforilação tanto da eNOS quanto da Akt (CHAMBLISS; SHAUL, 2002; FLORIAN; FREIMAN; MAGDER, 2004), o tratamento crônico com DN poderia indiretamente, via a redução de estrogênio, diminuir a fosforilação destas proteínas. Além disso, enquanto evidências mostram que o treinamento de contra-resistência pode aumentar a biodisponibilidade de NO (GALDINO et al., 2015), o nosso e outros resultados (GÜZEL; HAZAR; ERBAS, 2007; MOTA et al., 2015) levam a acreditar que essa modulação da via do NO pelo treinamento físico contra-resistência é diretamente determinado pelas diferenças entre protocolos e intensidades de treinamento.

Sob condições fisiológicas, a atividade da eNOS é a maior contribuinte para a produção de NO na vasculatura (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A iNOS, cuja expressão é dificilmente detectada em células endoteliais vasculares e de músculo liso em condições fisiológicas (WU; TYML; WILSON, 2008), pode ter sua expressão aumentada após estimulação inflamatória ou de citocinas, o que contribui para lesão vascular e aumento do estresse oxidativo (XIA; ZWEIER, 1997; CHATTERJEE; CATRAVAS, 2008). Nossos resultados mostram que na presença do inibidor da iNOS o relaxamento induzido pela ACh nos LVMs do grupo ND + SED foi significativamente atenuado, mas a inibição farmacológica com AG não modificou a resposta nos grupos tratados com VEH e do grupo ND-EXC. Esta alteração na fisiologia vascular foi

confirmada por dados moleculares, evidenciando que a administração em longo prazo de DN pode estimular a expressão de iNOS em artérias mesentéricas de ratas fêmeas intactas. Em conjunto, nossos achados sugerem uma maior participação do NO proveniente da isoforma induzível da NOS nas respostas de relaxamento induzida pela ACh em ratas fêmeas tratadas com DN, alteração revertida pelo treinamento de resistência. No entanto, a contribuição da iNOS não foi capaz de compensar a deficiência de NO observada nas fêmeas tratadas o EAA, uma vez que estes animais mostraram respostas de relaxamento reduzidas à ACh.

Nossos dados estão de acordo com outros autores que observaram que doses supra terapêuticas de EAAs e de testosterona estimulando cascatas inflamatórias em diferentes tecidos (RIEZZO et al., 2014; AHMED, 2015; AMMAR et al., 2015). Notavelmente, entretanto, alguns estudos sugerem que a testosterona têm um impacto positivo na modulação da iNOS, inibindo a sua expressão em cultura de macrófagos (FRIEDL et al., 2000) ou mesmo reduzindo seu conteúdo proteico em tecido muscular de homens praticantes de musculação (CHAVOSHAN et al., 2012). Por outro lado, pesquisas utilizando ratas ovariectomizadas mostram que a expressão de iNOS é elevada em anéis de aorta e ramos mesentéricos e pode prejudicar a função vascular (TAMURA; YAMAGUCHI; KOGO, 2000; NAWATE et al., 2005; LAMAS et al., 2015). Tais dados sustentam a ideia de que a deficiência de estrogênio pode ser um mecanismo-chave pelo qual o DN induz a disfunção vascular em fêmeas. Consistentemente, nossos dados também mostram que ratas dos grupos OVX e SHAM + ND têm um prejuízo no relaxamento induzido pela ACh na presença de AG. Reforçando a hipótese de que a redução da biodisponibilidade de NO está envolvida no comprometimento das respostas vasculares no grupo tratado com o EAA, nós também mostramos um aumento na intensidade da banda da subunidade gp91^{phox} da

NADPH oxidase em vasos mesentéricos de fêmeas intactas tratadas com DN. É notório que o aumento das EROs pode contribuir diretamente para a diminuição da biodisponibilidade de NO bem como facilitar a instalação de um estado pró-oxidante, que por sua vez contribui para a instauração de um endotélio disfuncional (CAI; HARRISON, 2000; FÖRSTERMANN, 2010). Nesse sentido, atenção tem sido atraída para a NADPH oxidase, principal fonte de estresse oxidativo no SCV (CAI; HARRISON, 2000; MULLER; MORAWIETZ, 2009). Os andrógenos são conhecidos não só por induzir o estresse oxidativo (LIU; NAVARRO; MAUVAIS-JARVIS, 2010; SUN et al., 2013), mas também por reduzir a atividade de algumas enzimas antioxidantes. Riezzo e cols. (2014) mostraram que tanto a glutathione peroxidase quanto a glutathione redutase têm atividade diminuída em amostras de tecido renal de camundongos após o tratamento DN. Resultados similares foram descritos por Dornelles e cols. (2017) os quais mostraram não somente uma redução da atividade da glutathione, bem como um aumento dos níveis de EROS e peroxidação lipídica no fígado e rins de ratos machos tratados com os EAAs estanozolol e undecilenato de boldenona. De maneira oposta, outros antioxidantes endógenos como a catalase e superóxido dismutase de complexos de manganês (MnSOD) não foram alteradas pelo DN em segmentos aórticos de ratos machos (SUN et al., 2013). Ainda com relação à NADPH oxidase, Frankenfeld e cols. (2014) recentemente descreveram que as alterações induzidas pelo DN na expressão do mRNA da NADPH oxidase são tecido-específicas em machos após 8 semanas de tratamento com o EAA. Esses achados da literatura apoiam os nossos resultados de que o tratamento com DN podem induzir estresse oxidativo em vasos mesentéricos de fêmeas.

Somando-se a esta discussão, nossos resultados apontam que nem o componente de relaxamento EDHF, tampouco os PGs foram alterados pelo tratamento com DN,

pelo treinamento físico ou pela deficiência de estrogênio nos LVMs de ratas fêmeas. O efeito inibitório do L-NAME no relaxamento induzido pela ACh não foi modificado pelo bloqueio das PGs derivadas da COX, com base na análise farmacológica utilizando o bloqueio simultâneo com L-NAME e INDO. A dilatação residual após o bloqueio das vias NO / PGs (L-NAME + INDO) revelou que o EDHF contribui substancialmente para o relaxamento do LVM, apoiando a descoberta anterior de Liu e cols. (2001), embora este fator não tenha sido alterado entre todos os grupos estudados. Apesar de experimentos demonstrarem o papel putativo dos hormônios sexuais na modulação desses dois fatores relaxantes, variações na contribuição do EDHF e/ou PGs para o relaxamento vascular foram atribuídas ao uso de diferentes segmentos arteriais, estado de deficiência estrogênica ou níveis de andrógenos (WAKASUGI et al., 1989; ORSHAL; KHALIL, 2004; NAWATE et al., 2005; CHINNATHAMBI et al., 2014).

Particularmente sobre o EDHF, apesar deste fator ser conhecido por desempenhar um papel mais proeminente no relaxamento dependente do endotélio em vasos de resistência versus de condutância (SHIMOKAWA et al., 1996; WOODMAN; WONGSAWATKUL; SOBEY, 2000), nossos dados sugerem uma contribuição ligeiramente maior do NO nas respostas de relaxamento do LVM em detrimento a participação do EDHF. Resultados similares utilizando preparações isoladas de LVMs foram descritos por estudos do nosso laboratório (CALIMAN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; LAMAS et al., 2015), sendo que Oliveira (2012) fez uma análise detalhada em seu estudo a fim de verificar a consistência dos valores de participação de NO e de EDHF obtidos através dos mesmos métodos de análise utilizados no presente trabalho. Ainda sobre este assunto, Hilgers e cols. (2006) mostraram uma heterogeneidade na modulação da resposta mediada pelo EDHF em artérias

mesentéricas. Estes autores mostraram que a expressão e contribuição funcional de diferentes tipos de canais de potássio ativados por cálcio (de baixa e intermediária condutância) variam entre os ramos mesentéricos de primeira e quarta ordem. De fato, nossos dados foram obtidos se avaliando o LVM como um todo, no qual estão presentes segmentos de pequeno, médio e grande resistência, o que em parte, poderia explicar nossos resultados. Além disso, a avaliação da resposta de relaxamento mediada pelo componente EDHF foi avaliada de maneira indireta neste estudo. Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade de o tratamento com DN promover alterações na via do EDHF, visto que outras fontes de EDHF são encontradas nos vasos além das investigadas por nosso estudo (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; SHIMOKAWA, 2010).

A literatura pertinente aos EAAs atuando sobre a via dos PGs ou sobre o EDHF em segmentos vasculares é, para o nosso conhecimento, inexistente. Múltiplas buscas em sites de pesquisa biomédica utilizando os descritores “EDHF”, “anabolic androgenic steroids (AAS)” e “prostanoids” apontaram o nosso recente artigo publicado (CALIMAN et al., 2017) como o único resultado da busca. No tocante da modulação destes fatores de relaxamento endotelial pela testosterona a bibliografia ainda se mostra escassa e com resultados divergentes. A citar alguns exemplos, uma série de estudos publicados por Chinnathambi e cols. avaliou alterações vasculares induzidas pelo tratamento com testosterona durante o período de gravidez, bem como na prole destas fêmeas (CHINNATHAMBI et al., 2013, 2014; CHINNATHAMBI; YALLAMPALLI; SATHISHKUMAR, 2013). Suscintamente, estes autores observaram que o relaxamento mediado por PGI_2 e pelo EDHF foi afetado nas artérias uterinas de ratas grávidas tratadas com testosterona (CHINNATHAMBI et al., 2014), mas não no LVM (CHINNATHAMBI et al., 2013). Gonzales e cols. (2004), por sua vez, sugeriram

que a testosterona pode modular o tônus vascular em pequenas artérias cerebrais principalmente via modulação de EDHF. Tais autores também mostraram, no mesmo trabalho, que a diferença no diâmetro luminal das artérias de ratos castrados e castrados tratados com testosterona não se alterara após o bloqueio farmacológico com INDO. Por fim, Tep-areenan e cols. (2002) observaram que concentrações crescentes de testosterona induziram relaxamento em LVMs isolados de ratos machos predominantemente via ativação de canais de potássio ativado por cálcio, o que sugere a participação do EDHF. Surpreendentemente, o vasorelaxamento induzido pela testosterona não foi abolido em presença de antagonista do receptor de androgênio (flutamida) sugerindo que o efeito da testosterona poderia ser mediado por uma via independente de AR.

A figura 27 resume de forma esquemática os principais resultados obtidos neste trabalho bem como os mecanismos propostos que resultam em disfunção endotelial e, por conseguinte, redução do relaxamento vascular induzidos pelo DN.

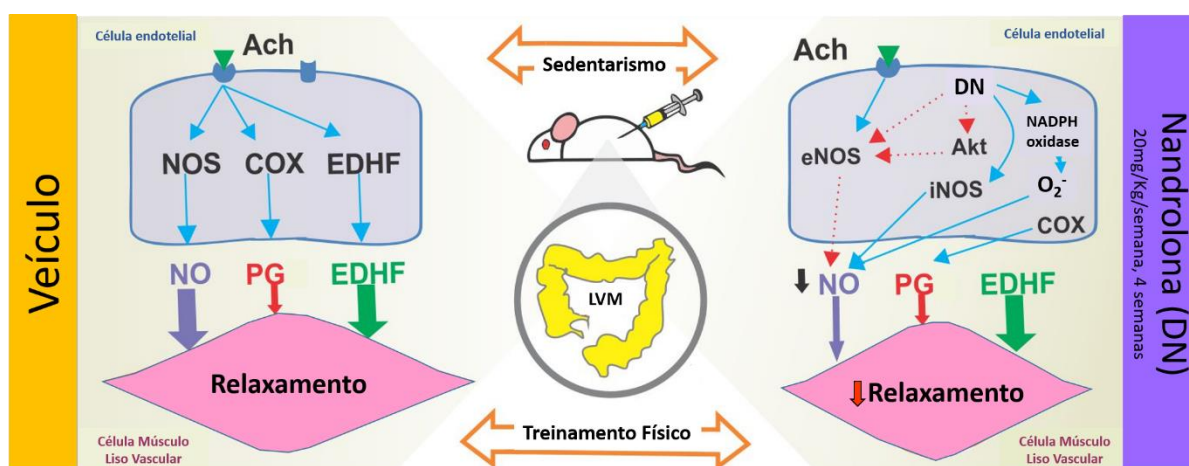


Figura 27. Representação esquemática dos principais resultados obtidos no presente estudo. Os mecanismos propostos que resultam em disfunção de relaxamento vascular nos LVMs obtidos de ratas fêmeas sedentárias ou submetidas a treinamento físico tratadas com doses supra terapêuticas de DN estão descritos à direita da ilustração. As setas pontilhadas indicam inibição/redução da via, enquanto as contínuas, estimulação. Modificado de Caliman e cols. (2017)

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam, de modo ainda não descrito na literatura, os mecanismos pelos quais o tratamento com DN promove o prejuízo da reatividade vascular em fêmeas intactas sedentárias ou submetidas ao treinamento físico. Somam-se aos resultados de reatividade vascular as alterações de perfil hormonal e de características biométricas nas fêmeas tratadas com DN, as quais, em conjunto, fazem com que estes animais apresentem perfil similar a ratas ovariectomizadas. Embora sugerimos um mecanismo paralelo focando as consequências da deficiência de estrogênio nas fêmeas tratadas com DN, não podemos excluir o papel dos andrógenos nas alterações observadas em nossos experimentos.

Por fim, nossos achados levantam a possibilidade de que o tratamento com DN aumente o risco de lesão vascular no sexo feminino, condição que poderia predispor ao surgimento de DCV.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAHIN, O. S. C.; DE SOUSA, E. C.; SANTOS, A. M. Prevalence of the use of anabolic-androgenic steroids in Brazil: a systematic review. **Substance use & misuse**, v. 49, n. 9, p. 1156–62, 2014.
- ABREU, A. R.; DE ABREU, A. R.; SANTOS, L. T.; DE SOUZA, A. A.; DA SILVA, L. G.; CHIANCA, D. A.; DE MENEZES, R. C. Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. **Neuroscience**, v. 262, p. 21–30, 14 mar. 2014.
- ACHAR, S.; ROSTAMIAN, A.; NARAYAN, S. M. Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm. **American Journal of Cardiology**, v. 106, n. 6, p. 893–901, 2010.
- AGIS-BALBOA, R. C.; PIBIRI, F.; NELSON, M.; PINNA, G. Enhanced fear responses in mice treated with anabolic androgenic steroids. **Neuroreport**, v. 20, n. 6, p. 617–621, 2009.
- AHLGRIM, C.; GUGLIN, M. Anabolics and Cardiomyopathy in a Bodybuilder: Case Report and Literature Review. **Journal of Cardiac Failure**, v. 15, n. 6, p. 496–500, 2009.
- AHMED, M. A. E. Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 282, n. 3, p. 285–96, 1 fev. 2015.
- AJAYI, A. A. L.; MATHUR, R.; HALUSHKA, P. V. Testosterone Increases Human Platelet Thromboxane A2 Receptor Density and Aggregation Responses. **Circulation**, v. 91, n. 11, p. 2742–2747, 1 jun. 1995.
- ALDHAHI, W.; HAMDY, O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. **Current diabetes reports**, v. 3, n. 4, p. 293–8, ago. 2003.
- ALTSCHULE, M. D.; TILLOTSON, K. J. The use of testosterone in the treatment of depressions. **The New England journal of medicine**, v. 239, n. 27, p. 1036–8, 30 dez. 1948.
- AMBAR, G.; CHIAVEGATTO, S. Anabolic-androgenic steroid treatment induces behavioral disinhibition and downregulation of serotonin receptor messenger RNA in the prefrontal cortex and amygdala of male mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, p. 161–173, 2009.
- AMMAR, A. E.; ESMAT, A.; HASSONA, M. D. H.; TADROS, M. G.; ABDEL-NAIM, A. B.; GUNS, E. S. T. The effect of pomegranate fruit extract on testosterone-induced BPH in rats. **The Prostate**, v. 75, n. 7, p. 679–92, maio 2015.
- AMMAR, E. M.; SAID, S. A.; HASSAN, M. S. Enhanced vasoconstriction and reduced vasorelaxation induced by testosterone and nandrolone in hypercholesterolemic rabbits. **Pharmacological research**, v. 50, n. 3, p. 253–9, set. 2004.
- APOSTOLOPOULOS, V.; BORKOLES, E.; POLMAN, R.; STOJANOVSKA, L.

Physical and immunological aspects of exercise in chronic diseases. **Immunotherapy**, v. 6, n. 10, p. 1145–1157, out. 2014.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269–304, jul. 2001.

ARENAS, I. a; ARMSTRONG, S. J.; XU, Y.; DAVIDGE, S. T. Chronic tumor necrosis factor-alpha inhibition enhances NO modulation of vascular function in estrogen-deficient rats. **Hypertension**, v. 46, n. 1, p. 76–81, jul. 2005.

ARNAL, J. F.; FONTAINE, C.; BILLON-GALES, A.; FAVRE, J.; LAURELL, H.; LENFANT, F.; GOURDY, P. **Estrogen receptors and endothelium Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2010. .

ASHOR, A. W.; LARA, J.; SIERVO, M.; CELIS-MORALES, C.; OGGIONI, C.; JAKOVLJEVIC, D. G.; MATHERS, J. C. **Exercise Modalities and Endothelial Function: A Systematic Review and Dose–Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials Sports Medicine**, fev. 2015. .

ATTARDI, B. J.; HILD, S. A.; REEL, J. R. Dimethandrolone undecanoate: A new potent orally active androgen with progestational activity. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 3016–3026, jun. 2006.

ATTARDI, B. J.; PAGE, S. T.; HILD, S. A.; COSS, C. C.; MATSUMOTO, A. M. Mechanism of action of bolandiol (19-nortestosterone-3 β ,17 β -diol), a unique anabolic steroid with androgenic, estrogenic, and progestational activities. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 3, p. 151–161, 15 fev. 2010.

BABER, S. R.; DENG, W.; RODRIGUEZ, J.; MASTER, R. G.; BIVALACQUA, T. J.; HYMAN, A. L.; KADOWITZ, P. J. Vasoactive prostanoids are generated from arachidonic acid by COX-1 and COX-2 in the mouse. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 289, n. 4, p. H1476-87, out. 2005.

BAGGISH, A. L.; WEINER, R. B.; KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; PICARD, M. H.; HUTTER, A. M.; POPE, H. G. Long-term anabolic-androgenic steroid use is associated with left ventricular dysfunction. **Circulation: Heart Failure**, v. 3, n. 4, p. 472–476, jul. 2010.

BAHRKE, M. S.; YESALIS, C. E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 614–620, dez. 2004.

BARCELOUX, D. G.; PALMER, R. B. Anabolic-androgenic steroids. **Disease-a-month : DM**, v. 59, n. 6, p. 226–48, jun. 2013.

BARRON, L. A.; GREEN, G. M.; KHALIL, R. A. Gender differences in vascular smooth muscle reactivity to increases in extracellular sodium salt. In: Hypertension, 2 II, **Anais...** fev. 2002.

BARROS NETO, T. L. de. A controvérsia dos agentes ergogênicos: Estamos subestimando os efeitos naturais da atividade física? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 2, p. 121–122, abr. 2001.

BASARIA, S.; WAHLSTROM, J. T.; DOBS, A. S. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5108–17, nov. 2001.

BASUALTO-ALARCÓN, C.; JORQUERA, G.; ALTAMIRANO, F.; JAIMOVICH, E.; ESTRADA, M. Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 45, n. 9, p. 1712–20, set. 2013.

BELARDIN, L. B.; SIMÃO, V. A.; LEITE, G. A. A.; CHUFFA, L. G. de A.; CAMARGO, I. C. C. Dose-dependent effects and reversibility of the injuries caused by nandrolone decanoate in uterine tissue and fertility of rats. **Birth defects research (Part B)**, v. 101, n. 2, p. 168–77, abr. 2014.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 93, n. 1, p. 43–8, jan. 2005.

BISSOLI, N. S.; MEDEIROS, A. R. S.; SANTOS, M. C. S.; BUSATO, V. C. W.; JARSKE, R. D.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; DE ANDRADE, T. U. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. **Pharmacological research**, v. 59, n. 6, p. 379–84, jun. 2009.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, 28 abr. 1994.

BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143–1211, abr. 2012.

BORDBAR, H.; MESBAH, F.; TALAEI, T.; DEHGHANI, F.; MIRKHANI, H. Modulatory effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a stereological study. **Iranian journal of medical sciences**, v. 39, n. 1, p. 44–50, jan. 2014.

BOS, C. L.; RICHEL, D. J.; RITSEMA, T.; PEPPELENBOSCH, M. P.; VERSTEEG, H. H. **Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, jul. 2004. .

BRANDES, R. P.; SCHMITZ-WINNENTHAL, F. H.; FÉLÉTOU, M.; GÖDECKE, A.; HUANG, P. L.; VANHOUTTE, P. M.; FLEMING, I.; BUSSE, R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9747–9752, 15 ago. 2000.

BRASIL, G. A.; LIMA, E. M. de; NASCIMENTO, A. M. do; CALIMAN, I. F.; MEDEIROS, A. R. S. de; SILVA, M. S. B.; ABREU, G. R. de; REIS, A. M. Dos; ANDRADE, T. U. de; BISSOLI, N. S. Nandrolone decanoate induces cardiac and renal remodeling in female rats, without modification in physiological parameters: The role of ANP system. **Life sciences**, v. 137, p. 65–73, 15 out. 2015.

BRUDER-NASCIMENTO, T.; CORDELLINI, S. Vascular adaptive responses to physical exercise and to stress are affected differently by nandrolone administration. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. April, p. 337–344, 2011.

BRUM, P. C.; FORJAZ, C.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C. E. Adaptações agudas e

crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev Paul Educ Física**, v. 18, p. 21–31, 2004.

BUCKLEY, W. E.; YESALIS, C. E.; FRIEDL, K. E.; ANDERSON, W. A.; STREIT, A. L.; WRIGHT, J. E. Estimated Prevalence of Anabolic Steroid Use Among Male High School Seniors. **JAMA**, v. 260, n. 23, p. 3441–3445, 16 dez. 1988.

BUTENANDT, A.; HANISCH, G. Über die Umwandlung des Dehydro-androsterons in Δ^4 -Androsten-ol-(17)-On-(3) (Testosteron); ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin (Vorläuf. Mitteil.). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 68, n. 9, p. 1859–1862, 11 set. 1935.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 10 nov. 2000.

CAL ABAD, C. C.; SILVA, R. S. da; MOSTARDA, C.; SILVA, I. C. de M. da; IRIGOYEN, M. C. Efeito do exercício aeróbico e resistido no controle autonômico e nas variáveis hemodinâmicas de jovens saudáveis. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte (Impresso)**, v. 24, n. 4, p. 535–544, 2010.

CALIMAN, I. F. **Mecanismos de prejuízo do relaxamento via endotélio e o estresse oxidativo são revertidos pela atorvastatina em ratas ovariectomizadas**. 2012. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

CALIMAN, I. F.; BERNABE, C. S.; DE MELO, A. F.; BRASIL, G. A.; DO NASCIMENTO, A. M.; DE LIMA, E. M.; FIGUEIREDO, S. G.; DE ANDRADE, T. U.; BISSOLI, N. S. Long-term Treatment with Nandrolone Decanoate Impairs Mesenteric Vascular Relaxation in both Sedentary and Exercised Female Rats. **Steroids**, 9 fev. 2017.

CALIMAN, I. F.; LAMAS, A. Z.; DALPIAZ, P. L. M.; MEDEIROS, A. R. S.; ABREU, G. R.; GOMES FIGUEIREDO, S.; NASCIMENTO GUSMÃO, L.; UGGERE ANDRADE, T.; SOUZA BISSOLI, N. Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are restored by atorvastatin therapy in ovariectomized rats. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80892, jan. 2013.

CAMPOREZ, J. P. G.; AKAMINE, E. H.; DAVEL, A. P.; FRANCI, C. R.; ROSSONI, L. V.; CARVALHO, C. R. D. O. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 10, p. 2585–96, 15 maio 2011.

CANUTO, M. H. A.; FERREIRA, R. A.; GUIMARÃES, E. M. de B. Uso e abuso de drogas ilícitas por jovens do 1º ano da Universidade Federal de Goiás. **Rev. paulista de pediatria**, v. 24, p. 135–142, 2006.

CARDOSO, C. G.; GOMIDES, R. S.; QUEIROZ, A. C. C.; PINTO, L. G.; DA SILVEIRA LOBO, F.; TINUCCI, T.; MION, D.; DE MORAES FORJAZ, C. L. Acute and chronic effects of aerobic and resistance exercise on ambulatory blood pressure. **Clinics**, v. 65, n. 3, p. 317–25, 2010.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 100, n. 2, p. 126–31, 1985.

CASTOR, L. R. G.; OBA, E.; PEREIRA, O. C. M. Effects of swimming and nandrolone decanoate treatment on vas deferens response to norepinephrine. **Life sciences**, v. 85, n. 13–14, p. 541–5, 23 set. 2009.

CAUGHEY, G. E.; CLELAND, L. G.; PENGLIS, P. S.; GAMBLE, J. R.; JAMES, M. J. Roles of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cells: Selective Up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2831–2838, 2001.

CHAMBLISS, K. L.; SHAUL, P. W. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 5, p. 665–86, out. 2002.

CHATAIGNEAU, T.; ZERR, M.; CHATAIGNEAU, M.; HUDLETT, F.; HIRN, C.; PERNOT, F.; SCHINI-KERTH, V. B. Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats. **Menopause**, v. 11, n. 3, p. 255–63, 2004.

CHATTERJEE, A.; CATRAVAS, J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. **Vascular pharmacology**, v. 49, n. 4–6, p. 134–40, 2008.

CHAVES, E. A.; PEREIRA-JUNIOR, P. P.; FORTUNATO, R. S.; MASUDA, M. O.; DE CARVALHO, A. C. C.; DE CARVALHO, D. P.; OLIVEIRA, M. F.; NASCIMENTO, J. H. M. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: Role of antioxidant enzymes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, p. 223–230, 2006.

CHAVOSHAN, B.; FOURNIER, M.; LEWIS, M. I.; PORZASZ, J.; STORER, T. W.; DA, X.; RAMBOD, M.; CASABURI, R. Testosterone and resistance training effects on muscle nitric oxide synthase isoforms in COPD men. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 2, p. 269–275, 2012.

CHINNATHAMBI, V.; BALAKRISHNAN, M.; RAMADOSS, J.; YALLAMPALLI, C.; SATHISHKUMAR, K. Testosterone alters maternal vascular adaptations: role of the endothelial NO system. **Hypertension**, v. 61, n. 3, p. 647–54, mar. 2013.

CHINNATHAMBI, V.; BLESSON, C. S.; VINCENT, K. L.; SAADE, G. R.; HANKINS, G. D.; YALLAMPALLI, C.; SATHISHKUMAR, K. Elevated testosterone levels during rat pregnancy cause hypersensitivity to angiotensin II and attenuation of endothelium-dependent vasodilation in uterine arteries. **Hypertension**, v. 64, n. 2, p. 405–14, ago. 2014.

CHINNATHAMBI, V.; YALLAMPALLI, C.; SATHISHKUMAR, K. Prenatal testosterone induces sex-specific dysfunction in endothelium-dependent relaxation pathways in adult male and female rats. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 4, p. 97, out. 2013.

CHODARI, L.; MOHAMMADI, M.; MOHADDES, G.; ALIPOUR, M. R.; GHORBANZADE, V.; DARIUSHNEJAD, H.; MOHAMMADI, S. Testosterone and Voluntary Exercise, Alone or Together Increase Cardiac Activation of AKT and ERK1/2 in Diabetic Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 6, p. 532, 2016.

CHOU, T. M.; SUDHIR, K.; HUTCHISON, S. J.; KO, E.; AMIDON, T. M.; COLLINS, P.; CHATTERJEE, K. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. **Circulation**, v. 94, n. 10, p. 2614–9, 15 nov. 1996.

CHRISTENSEN, K. L.; MULVANY, M. J. Mesenteric arcade arteries contribute

substantially to vascular resistance in conscious rats. **Journal of vascular research**, v. 30, n. 2, p. 73–9, 1993.

CLARK, A. S.; COSTINE, B. A.; JONES, B. L.; KELTON-REHKOPF, M. C.; MEERTS, S. H.; NUTBROWN-GREENE, L. L.; PENATTI, C. A. A.; PORTER, D. M.; YANG, P.; HENDERSON, L. P. Sex- and age-specific effects of anabolic androgenic steroids on reproductive behaviors and on GABAergic transmission in neuroendocrine control regions. **Brain research**, v. 1126, n. 1, p. 122–38, 18 dez. 2006.

CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 413–436, 2003.

CLARKSON, P.; MONTGOMERY, H. E.; MULLEN, M. J.; DONALD, A. E.; POWE, A. J.; BULL, T.; JUBB, M.; WORLD, M.; DEANFIELD, J. E. Exercise training enhances endothelial function in young men. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 33, n. 5, p. 1379–85, abr. 1999.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization. **Circulation**, v. 92, n. 11, 1995.

CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**Ministério da Ciência, Tecnologia e InovaçãoMinistério da Ciência, Tecnologia e Inovação, , 2015. .

CREWS, J. K.; KHALIL, R. A. Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 9, p. 707–715, set. 1999.

CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 165–179, 2004.

CUNHA, T. S.; MOURA, M. J. C. S.; BERNARDES, C. F.; TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. **Hypertension**, v. 46, p. 1010–1015, 2005.

CUNHA, T. S.; TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K.; PEREZ, S. E. A.; SELISTRE-ARAÚJO, H. S. A Administração de Nandrolona Não Promove Hipertrofia do Músculo Sóleo em Ratos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 3, p. 532–40, 2006.

DALLE LUCCA, J. J.; ADEAGBO, A. S.; ALSIP, N. L. Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 15, n. 4, p. 961–8, abr. 2000.

DALPIAZ, P. L. M.; LAMAS, a Z.; CALIMAN, I. F.; MEDEIROS, a R. S.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; ANDRADE, T. U.; ALVES, M. F.; CARMONA, a K.; BISSOLI, N. S. The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 46, n. 2, p. 171–7, fev. 2013.

DANIEL, T. O.; IVES, H. E. Endothelial control of vascular function. **News In Physiological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 139–142, 1989.

DANZIGER, L.; SCHROEDER, H. T.; UNGER, A. A.; GUIRDHAM, A.; WERNER, A.

A.; ZEIFERT, M.; DANZIGER, L., AND BLANK, H. R. Androgen therapy for involutional melancholia. **Archives of Neurology And Psychiatry**, v. 51, n. 5, p. 457, 1 maio 1944.

DART, A. M.; DU, X.-J.; KINGWELL, B. a. Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. **Cardiovascular research**, v. 53, n. 3, p. 678–87, 15 fev. 2002.

DAS NEVES, V. J.; TANNO, A. P.; CUNHA, T. S.; FERNANDES, T.; GUZZONI, V.; DA SILVA, C. A.; DE OLIVEIRA, E. M.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Effects of nandrolone and resistance training on the blood pressure, cardiac electrophysiology, and expression of atrial β -adrenergic receptors. **Life Sciences**, v. 92, n. 20–21, p. 1029–1035, 2013.

DAVID, K.; DINGEMANSE, E.; FREUD, J.; LAQUEUR, E. Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v. 233, n. 5–6, p. 281–283, jan. 1935.

DAVIDGE, S. T.; ZHANG, Y. Estrogen replacement suppresses a prostaglandin H synthase-dependent vasoconstrictor in rat mesenteric arteries. **Circulation research**, v. 83, n. 4, p. 388–95, 24 ago. 1998.

DE ALMEIDA CHUFFA, L. G.; DE SOUZA, R. B.; FREI, F.; DE FÁTIMA PACCOLA MESQUITA, S.; CAMARGO, I. C. C. Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, v. 294, n. 2, p. 335–41, fev. 2011.

DE GOOYER, M. E.; OPPERS-TIEMISSEN, H. M.; LEYSEN, D.; VERHEUL, H. A. M.; KLOOSTERBOER, H. J. Tibolone is not converted by human aromatase to 7 α -methyl-17 α -ethynylestradiol (7 α -MEE): Analyses with sensitive bioassays for estrogens and androgens and with LC-MSMS. **Steroids**, v. 68, n. 3, p. 235–243, 2003.

DE KRUIF, P. The male homone. **Harcourt, Brace and company**, v. 1st editio, p. 243, 1945.

DE MEDEIROS, A. R. S.; LAMAS, A. Z.; CALIMAN, I. F.; DALPIAZ, P. L. M.; FIRMES, L. B.; DE ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; LEMOS, E. M.; DOS REIS, A. M.; BISSOLI, N. S. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. **Regulatory peptides**, v. 179, n. 1–3, p. 55–60, 10 nov. 2012.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. **Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance** **Circulation**, 2007. .

DE SIQUEIRA NOGUEIRA, F. R.; DE FREITAS BRITO, A.; DE OLIVEIRA, C. V. C.; VIEIRA, T. I.; BENIZ GOUVEIA, R. L. Anabolic–Androgenic Steroid Use Among Brazilian Bodybuilders. **Substance Use & Misuse**, v. 49, n. 9, p. 1138–1145, 2014.

DE VISSER, J.; OVERBEEK, G. A. Pharmacological properties of nandrolone decanoate. **Acta endocrinologica**, v. 35, p. 405–412, nov. 1960.

DI BELLO, V.; GIORGI, D.; BIANCHI, M.; BERTINI, a; CAPUTO, M. T.; VALENTI, G.; FURIOSO, O.; ALESSANDRI, L.; PATERNI, M.; GIUSTI, C. Effects of anabolic-androgenic steroids on weight-lifters' myocardium: an ultrasonic videodensitometric study. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 4, p. 514–521, 1999.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 601–5, 10 jun. 1999.

DING, A. Q.; STALLONE, J. N. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 6, p. 2742–2750, dez. 2001.

DORNELLES, G. L.; BUENO, A.; DE OLIVEIRA, J. S.; DA SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; DA SILVA, C. B.; MACHADO, M. S. N.; PETRY, L. do S.; ABDALLA, F. H.; LHAMAS, C. L.; DE ANDRADE, C. M. Biochemical and oxidative stress markers in the liver and kidneys of rats submitted to different protocols of anabolic steroids. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 425, n. 1–2, p. 181–189, 28 jan. 2017.

DOS SANTOS, R. L.; DA SILVA, F. B.; RIBEIRO, R. F.; STEFANON, I. Sex hormones in the cardiovascular system. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 2, p. 89–103, 2014.

DOTSON, J. L.; BROWN, R. T. The History of the Development of Anabolic-Androgenic Steroids. **Pediatric Clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 761–769, 2007.

DUCHANE, D. **The Original Underground Steroid Handbook**. Venice, CA: OEM Media, 1981.

DUCHANE, D. **Underground Steroid Handbook**. Venice, CA: OEM Media, 1983.

DUCHANE, D. **Underground Steroid Handbook II**. Los Angeles, CA: HLR Technical Books, 1989.

EBENBICHLER, C. F.; STURM, W.; GÄNZER, H.; BODNER, J.; MANGWETH, B.; RITSCH, A.; SANDHOFER, A.; LECHLEITNER, M.; FÖGER, B.; PATSCH, J. R. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. **Atherosclerosis**, v. 158, n. 2, p. 483–90, out. 2001.

EDWARDS, G.; DORA, K. A.; GARDENER, M. J.; GARLAND, C. J.; WESTON, A. H. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 269–272, 19 nov. 1998.

EISENBERG, M. E.; WALL, M.; NEUMARK-SZTAINER, D. Muscle-enhancing behaviors among adolescent girls and boys. **Pediatrics**, v. 130, p. 1019–26, 2012.

ELIAKIM, A.; CALE-BENZOOR, M.; KLINGER-CANTOR, B.; FREUD, E.; NEMET, D.; FEIGIN, E.; WEINTROB, N. A case study of virilizing adrenal tumor in an adolescent female elite tennis player--insight into the use of anabolic steroids in young athletes. **Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association**, v. 25, n. 1, p. 46–50, jan. 2011.

ELLIOT, D. L.; CHEONG, J.; MOE, E. L.; GOLDBERG, L. Cross-sectional study of female students reporting anabolic steroid use. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 161, n. 6, p. 572–7, jun. 2007.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **The American journal of sports medicine**, v. 32, n. 2, p. 534–542, mar. 2004.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H. C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 513–556, dez. 2000.

FARHAT, M. Y.; WOLFE, R.; VARGAS, R.; FOEGH, M. L.; RAMWELL, P. W. Effect of testosterone treatment on vasoconstrictor response of left anterior descending coronary artery in male and female pigs. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 495–500, mar. 1995.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical science**, v. 117, n. 4, p. 139–55, ago. 2009.

FERRER, M.; ENCABO, a; MARÍN, J.; BALFAGÓN, G. Treatment with the anabolic steroid, nandrolone, reduces vasoconstrictor responses in rabbit arteries. **European journal of pharmacology**, v. 258, p. 103–110, 1994.

FINESCHI, V.; BAROLDI, G.; MONCIOTTI, F.; PAGLICCI REATTELLI, L.; TURILLAZZI, E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 125, n. 2, p. 253–5, fev. 2001.

FISLTHALER, B.; POPP, R.; KISS, L.; POTENTE, M.; HARDER, D.; FLEMING, I.; R, B. **Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries** *Nature*, 30 set. 1999. .

FLORIAN, M.; FREIMAN, A.; MAGDER, S. Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. **Steroids**, v. 69, n. 13–14, p. 779–87, dez. 2004.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 923–39, maio 2010.

FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E. I.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1121–1131, jun. 1994.

FRAGKAKI, A. G.; ANGELIS, Y. S.; KOUPPARIS, M.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; KOKOTOS, G.; GEORGAKOPOULOS, C. **Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure** *Steroids*, fev. 2009. .

FRANKE, W. W.; BERENDONK, B. Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1262–79, jul. 1997.

FRANKENFELD, S. P.; OLIVEIRA, L. P.; ORTENZI, V. H.; REGO-MONTEIRO, I. C. C.; CHAVES, E. A.; FERREIRA, A. C.; LEITÃO, A. C.; CARVALHO, D. P.; FORTUNATO, R. S. The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male Wistar rats. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e102699, jan. 2014.

FRANQUNI, J. V. M.; DO NASCIMENTO, A. M.; DE LIMA, E. M.; BRASIL, G. A.; HERINGER, O. A.; CASSARO, K. O. dos S.; DA CUNHA, T. V. P.; MUSSO, C.; SILVA SANTOS, M. C. L. F.; KALIL, I. C.; ENDRINGER, D. C.; BOECHAT, G. A. P.; BISSOLI,

N. S.; DE ANDRADE, T. U. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 379–385, 2013.

FREEMAN, E. R.; BLOOM, D. A.; MCGUIRE, E. J. A brief history of testosterone. **The Journal of urology**, v. 165, n. 2, p. 371–3, fev. 2001.

FRIEDL, R.; BRUNNER, M.; MOESLINGER, T.; SPIECKERMANN, P. G. Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. **Life Sciences**, v. 68, n. 4, p. 417–429, dez. 2000.

FRIES, C. C.; FRIES, A. M.; WESOLOWSKI, S. A. Peripheral Vascular Tonus and Reactivity. **Archives of Surgery**, v. 86, n. 1, p. 13, 1 jan. 1963.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 9, p. 2007–18, jul. 1989.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 27 nov. 1980.

GALDINO, G. S.; XAVIER, C. H.; ALMEIDA, R.; SILVA, G.; FONTES, M. A.; MENEZES, G.; DUARTE, I. D.; PEREZ, A. C. The Nitric oxide/CGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats. **The International journal of neuroscience**, v. 125, n. 10, p. 765–73, jan. 2015.

GARGETT, C. E.; BUCAK, K.; ZAITSEVA, M.; CHU, S.; TAYLOR, N.; FULLER, P. J.; ROGERS, P. A. W. Estrogen receptor- α and - β expression in microvascular endothelial cells and smooth muscle cells of myometrium and leiomyoma. **Molecular human reproduction**, v. 8, n. 8, p. 770–775, ago. 2002.

GEREZ, J. R.; FREI, F.; CAMARGO, I. C. C. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. **Contraception**, v. 72, n. 1, p. 77–80, jul. 2005.

GOLBIDI, S.; LAHER, I. Molecular Mechanisms in Exercise-Induced Cardioprotection. **Cardiology Research and Practice**, v. 2011, p. 1–15, 2011.

GOLDFIELD, G. S. Body image, disordered eating and anabolic steroid use in female bodybuilders. **Eating disorders**, v. 17, n. 3, p. 200–10, jan. 2009.

GOMES, H. L.; GRACELI, J. B.; GONÇALVES, W. L. S.; SANTOS, R. L.; ABREU, G. R.; BISSOLI, N. S.; PIRES, J. G. P.; CICILINI, M. A.; MOYSÉS, M. R. Influence of gender and estrous cycle on plasma and renal catecholamine levels in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 82, p. 75–82, 2012.

GONZALES, R. J.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 286, n. 2, p. H552–H560, fev. 2004.

GRAGASIN, F. S.; XU, Y.; ARENAS, I. A.; KAINTH, N.; DAVIDGE, S. T. Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n.

1, p. 38–44, 1 jan. 2003.

GRIFFITH, T. M.; TAYLOR, H. J. Cyclic AMP mediates EDHF-type relaxations of rabbit jugular vein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 263, n. 1, p. 52–57, 16 set. 1999.

GRIMES, J. M.; MELLONI, R. H. Serotonin modulates offensive attack in adolescent anabolic steroid-treated hamsters. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 73, n. 3, p. 713–21, out. 2002.

GUIRDHAM, A. Treatment of Mental Disorders with Male Sex Hormone. **British medical journal**, v. 1, n. 4122, p. 10–2, 6 jan. 1940.

GÜZEL, N. A.; HAZAR, S.; ERBAS, D. Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males. **Journal of sports science & medicine**, v. 6, n. 4, p. 417–22, jan. 2007.

HADI, H. A. R.; CARR, C. S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vascular health and risk management**, v. 1, n. 3, p. 183–98, 2005.

HALL, R. C. W.; HALL, R. C. W.; CHAPMAN, M. J. Psychiatric complications of anabolic steroid abuse. **Psychosomatics**, v. 46, n. 4, p. 285–90, 2005.

HARRISON, B. C.; BELL, M. L.; ALLEN, D. L.; BYRNES, W. C.; LEINWAND, L. A. Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)**, v. 92, n. 1, p. 313–322, 1 jan. 2002.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Medicine**, v. 34, n. 8, p. 513–554, 2004.

HASHEMI, M.; BAYAT, F.; HEIDARI, R.; BASIRATNIA, R.; KIYANI, Y. Endothelial function in male body builders taking anabolic androgenic steroids. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 10, n. 6, p. 371–376, 2005.

HASSAN, A. F.; KAMAL, M. M. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. **International journal of health sciences**, v. 7, n. 1, p. 37–49, 2013.

HASSAN, N. a; SALEM, M. F.; SAYED, M. a E. L. Doping and effects of anabolic androgenic steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiographic assessment in strength athletes. **Human & experimental toxicology**, v. 28, p. 273–283, 2009.

HAYNES, M. P.; SINHA, D.; RUSSELL, K. S.; COLLINGE, M.; FULTON, D.; MORALES-RUIZ, M.; SESSA, W. C.; BENDER, J. R. Membrane Estrogen Receptor Engagement Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase via the PI3-Kinase – Akt. **Circulation Research**, v. 13, n. 8, p. 677–682, 13 out. 2000.

HAYWARD, C. S.; KELLY, R. P.; COLLINS, P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. **Cardiovascular research**, v. 46, n. 1, p. 28–49, abr. 2000.

HENDERSON, J. Ernest Starling and “Hormones”: An historical commentary **Journal of Endocrinology**, jan. 2005. .

HILGERS, R. H. P.; TODD, J.; WEBB, R. C. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 1, p. H216–H222, 24 fev. 2006.

HOBERMAN, J. M.; YESALIS, C. E. The history of synthetic testosterone. **Scientific American**, v. 272, n. 2, p. 76–81, fev. 1995.

HOEPFL, B.; RODENWALDT, B.; POHL, U.; DE WIT, C. EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in hamster arterioles. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 3, p. H996–H1004, set. 2002.

HONDA, H.; UNEMOTO, T.; KOGO, H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 6, p. 1232–1236, 1999.

HOWLEY, E. T. Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S364-9-20, jun. 2001.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **SciencesNew York**, v. 84, n. December, p. 9265–9269, dez. 1987.

ILIESCU, R.; RECKELHOFF, J. F. Testosterone and vascular reactivity. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 111, n. 4, p. 251–2, out. 2006.

IP, E. J.; TRINH, K.; TENEROWICZ, M. J.; PAL, J.; LINDFELT, T. A.; PERRY, P. J. Characteristics and Behaviors of Older Male Anabolic Steroid Users. **Journal of pharmacy practice**, v. 28, n. 5, p. 450–6, out. 2015.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 173–8, 2000.

JENNINGS, J. H.; UNG, R. L.; RESENDEZ, S. L.; STAMATAKIS, A. M.; TAYLOR, J. G.; HUANG, J.; VELETA, K.; KANTAK, P. A.; AITA, M.; SHILLING-SCRIVO, K.; RAMAKRISHNAN, C.; DEISSEROTH, K.; OTTE, S.; STUBER, G. D. Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. **Cell**, v. 160, n. 3, p. 516–527, 2015.

JOHNSTON, L. D.; O'MALLEY, P. M.; BACHMAN, J. G.; SCHULENBERG, J. E. Monitoring the Future national survey results on drug use, 1975-2012: Volume I, Secondary school students. **National Institute on Drug Abuse, The University of Michigan**, 2013.

JONES, R. D.; ENGLISH, K. M.; PUGH, P. J.; MORICE, A. H.; JONES, T. H.; CHANNER, K. S. Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 814–823, jun. 2002.

JOSEFSSON, T.; LINDWALL, M.; ARCHER, T. **Physical exercise intervention in depressive disorders: Meta-analysis and systematic review** **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, abr. 2014. .

KANASHIRO, C. A.; KHALIL, R. A. Gender-related distinctions in protein kinase C

activity in rat vascular smooth muscle. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 280, n. 1, p. C34–C45, jan. 2001.

KANAYAMA, G.; AMIAZ, R.; SEIDMAN, S.; POPE, H. G. Testosterone supplementation for depressed men: current research and suggested treatment guidelines. **Experimental and clinical psychopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 529–38, dez. 2007.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: A looming public health concern? **Drug and Alcohol Dependence**, v. 98, p. 1–12, 2008.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Illicit anabolic-androgenic steroid use. **Hormones and behavior**, v. 58, n. 1, p. 111–21, jun. 2010.

KASIKCIOGLU, E.; OFLAZ, H.; ARSLAN, A.; TOPCU, B.; KASIKCIOGLU, H. A.; UMMAN, B.; BUGRA, Z.; KAYSERILIOGLU, A. Aortic elastic properties in athletes using anabolic-androgenic steroids. **International Journal of Cardiology**, v. 114, n. 1, p. 132–134, 2 jan. 2007.

KAWANO, H.; TANIMOTO, M.; YAMAMOTO, K.; SANADA, K.; GANDO, Y.; TABATA, I.; HIGUCHI, M.; MIYACHI, M. Resistance training in men is associated with increased arterial stiffness and blood pressure but does not adversely affect endothelial function as measured by arterial reactivity to the cold pressor test. **Experimental physiology**, v. 93, n. 2, p. 296–302, fev. 2008.

KAWASAKI, H.; TAKATORI, S.; ZAMAMI, Y.; KOYAMA, T.; GODA, M.; HIRAI, K.; TANGSUCHARIT, P.; JIN, X.; HOBARA, N.; KITAMURA, Y. **Paracrine control of mesenteric perivascular axo-axonal interaction** *Acta Physiologica*, set. 2011. .

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 502–21, 2008.

KING, L. The effects of resistance exercise on skeletal muscle abnormalities in patients with advanced heart failure. **Progress in cardiovascular nursing**, v. 16, n. 4, p. 142–151, 2001.

KNOWLTON, A. A.; LEE, A. R. Estrogen and the cardiovascular system. **Pharmacology & therapeutics**, v. 135, n. 1, p. 54–70, jul. 2012.

KONCAREVIC, A.; MORRIS, C.; JASUJA, R.; FLANAGAN, J.; MONTANO, M.; BHASIN, S.; LEBRASSEUR, N. Testosterone stimulates muscle growth in association with PI3-K/Akt signaling in subjects with HIV. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 6, p. A946–A947, 2007.

KOPERA, H. The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. **Acta endocrinologica. Supplementum**, v. 271, p. 11–18, 1985.

KORTHUIS, R. Skeletal Muscle Circulation: Regulation of Vascular Tone in Skeletal Muscle. **San Rafael, CA: Morgan and Claypool**, p. 1–24, 2011.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. **Fundamentals of Resistance Training: Progression and Exercise Prescription** *Medicine and Science in Sports and Exercise*, abr. 2004. .

KRUK, J. Physical activity in the prevention of the most frequent chronic diseases: An

analysis of the recent evidence. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 8, n. 3, p. 325–338, 2007.

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; CALVO, E.; MARTEL, C.; CLOUTIER, J.; GAUTHIER, S.; BELLEAU, P.; MORISSETTE, J.; LÉVESQUE, M. H.; LABRIE, C. Tetrahydrogestrinone induces a genomic signature typical of a potent anabolic steroid. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 427–433, fev. 2005.

LAMAS, A. **Efeito do tratamento com moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs) sobre a reatividade vascular e sobre os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias em ratas ovariectomizadas**. 2009. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

LAMAS, A. Z.; CALIMAN, I. F.; DALPIAZ, P. L. M.; DE MELO, A. F.; ABREU, G. R.; LEMOS, E. M.; GOUVEA, S. A.; BISSOLI, N. S. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. **Life sciences**, v. 124, p. 101–109, 24 jan. 2015.

LANE, H. A.; GRACE, F.; SMITH, J. C.; MORRIS, K.; COCKCROFT, J.; SCANLON, M. F.; DAVIES, J. S. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. **European journal of clinical investigation**, v. 36, n. 7, p. 483–8, jul. 2006.

LAVIE, C. J.; ARENA, R.; SWIFT, D. L.; JOHANNSEN, N. M.; SUI, X.; LEE, D.; EARNEST, C. P.; CHURCH, T. S.; O'KEEFE, J. H.; MILANI, R. V.; BLAIR, S. N. Exercise and the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 117, n. 2, p. 207–219, 2015.

LEBLANC, A. J.; REYES, R.; KANG, L. S.; DAILEY, R. A.; STALLONE, J. N.; MONINGKA, N. C.; MULLER-DELP, J. M. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 297, n. 6, p. R1713-23, dez. 2009.

LEE, B.-A.; OH, D.-J. The effects of long-term aerobic exercise on cardiac structure, stroke volume of the left ventricle, and cardiac output. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 12, n. 1, p. 37–41, fev. 2016.

LEWIS, M. I.; HORVITZ, G. D.; CLEMMONS, D. R.; FOURNIER, M. Role of IGF-I and IGF-binding proteins within diaphragm muscle in modulating the effects of nandrolone. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 282, n. 2, p. E483-90, 2002.

LIMA, E. M.; NASCIMENTO, A. M.; BRASIL, G. A.; KALIL, I. C.; LENZ, D.; ENDRINGER, D. C.; ANDRADE, T. U.; BISSOLI, N. S. Cardiopulmonary reflex, cardiac cytokines, and nandrolone decanoate: Response to resistance training in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 11, p. 985–991, nov. 2015.

LIRA, F. S.; NETO, J. C.; ANTUNES, B. M. M.; FERNANDES, R. A. The Relationship Between Inflammation, Dyslipidemia and Physical Exercise: From the Epidemiological to Molecular Approach. **Current Diabetes Reviews**, v. 10, n. 6, p. 391–396, 9 jan. 2015.

LIU, M. Y.; HATTORI, Y.; FUKAO, M.; SATO, a; SAKUMA, I.; KANNO, M. Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. **British journal of pharmacology**, v. 132, n. 5, p. 1035–46, mar. 2001.

LIU, P. Y.; DEATH, A. K.; HANDELSMAN, D. J. Androgens and cardiovascular disease. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 3, p. 313–40, jun. 2003.

LIU, S.; NAVARRO, G.; MAUVAIS-JARVIS, F. Androgen excess produces systemic oxidative stress and predisposes to beta-cell failure in female mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11302, 24 jun. 2010.

LOSEL, R.; WEHLING, M. **Nongenomic actions of steroid hormones** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , jan. 2003. .

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LUCAS, A. C. dos S.; PARENTE, R. C. P.; PICANÇO, N. S.; CONCEIÇÃO, D. A.; COSTA, K. R. C. da; MAGALHÃES, I. R. dos S.; SIQUEIRA, J. C. A. Uso de psicotrópicos entre universitários da área da saúde da Universidade Federal do Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 663–671, mar. 2006.

LÚCIA, C.; FORJAZ, D. M.; REZK, C. C.; MELO, C. M. De; SANTOS, D.; TEIXEIRA, L.; NERY, S.; TINUCCI, T. Exercício resistido para o paciente hipertenso : indicação ou contra-indicação. **Rev Bras Hipertens**, v. 10, n. 11, p. 119–124, 2003.

LUKAS, S. E. CNS effects and abuse liability of anabolic-androgenic steroids. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 36, p. 333–357, 1996.

LUZARDO, O. P.; MACHÍN, R. P.; DÍAZ-CHICO, B. N.; FERNÁNDEZ, L. Photoaffinity labeling identification of a specific binding protein for the anabolic steroids stanozolol and danazol: An oligomeric protein regulated by age, pituitary hormones, and ethinyl estradiol. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3377–3387, set. 2000.

MAIOR, A. S.; CARVALHO, A. R.; MARQUES-NETO, S. R.; MENEZES, P.; SOARES, P. P.; NASCIMENTO, J. H. M. Cardiac autonomic dysfunction in anabolic steroid users. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 23, p. 548–55, 2013.

MAIORANA, A.; DRISCOLL, G. O.; DEMBO, L.; CHEETHAM, C.; GOODMAN, C.; TAYLOR, R.; GREEN, D.; BERENDONCKS, A. M. Van; GARNIER, A.; BECKERS, P.; HOYMANS, V. Y.; POSSEMIERS, N.; FORTIN, D.; HOOF, V. Van; DEWILDE, S.; VRINTS, C. J.; WILDE, S. De; PADILLA, J.; SIMMONS, G. H.; BENDER, S. B.; ARCE-ESQUIVEL, A. a; WHYTE, J. J.; LAUGHLIN, M. H.; TAY-, R. Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 4, p. 1999–2005, 2011.

MALARKEY, W. B.; STRAUSS, R. H.; LEIZMAN, D. J.; LIGGETT, M.; DEMERS, L. M. Endocrine effects in female weight lifters who self-administer testosterone and anabolic steroids. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, n. 5 PART 1, p. 1385–1390, nov. 1991.

MARQUES NETO, S. R.; SILVA ADA, H.; SANTOS, M. C.; FERRAZ, E. F.; NASCIMENTO, J. H. M. The blockade of angiotensin AT1 and aldosterone receptors protects rats from synthetic androgen-induced cardiac autonomic dysfunction. **Acta Physiologica**, v. 208, p. 166–171, 2013.

MARTINI, L. **The 5alpha-reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications.** **Endocrine Reviews** Endocrine Society, , jan. 1982. .

MATOKA, T.; SHIMOKAWA, H.; NAKASHIMA, M.; HIRAKAWA, Y.; MUKAI, Y.; HIRANO, K.; KANAIDE, H.; TAKESHITA, A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1521–1530, 15 dez. 2000.

MCCREDIE, R. J.; MCCROHON, J. A.; TURNER, L.; GRIFFITHS, K. A.; HANDELSMAN, D. J.; CELERMAJER, D. S. Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 1331–5, nov. 1998.

MCCROHON, J. A.; JESSUP, W.; HANDELSMAN, D. J.; CELERMAJER, D. S. Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule-1. **Circulation**, v. 99, n. 17, p. 2317–22, 4 maio 1999.

MCGREGOR, D. D. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation on Vasoconstrictor Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. **Journal of Physiology**, v. 177, p. 21–30, 1965.

MEDEI, E.; MAROCOLO, M.; RODRIGUES, D. de C.; ARANTES, P. C.; TAKIYA, C. M.; SILVA, J.; RONDINELLI, E.; GOLDENBERG, R. C. D. S.; DE CARVALHO, A. C. C.; NASCIMENTO, J. H. M. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: Cellular, ionic and molecular mechanism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, n. 2, p. 165–175, ago. 2010.

MELCHERT, R. B.; WELDER, A. A. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 9, p. 1252–1262, set. 1995.

MELO, S. F. S.; BARAUNA, V. G.; CARNEIRO JÚNIOR, M. A.; BOZI, L. H. M.; DRUMMOND, L. R.; NATALI, A. J.; DE OLIVEIRA, E. M. Resistance training regulates cardiac function through modulation of miRNA-214. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 6855–6867, 26 mar. 2015.

MERCURO, G.; PITZALIS, L.; PODDA, A.; ZONCU, S.; PILIA, I.; MELIS, G. B.; CHERCHI, A. Effects of Acute Administration of Natural Progesterone on Peripheral Postmenopausal Women. **The American journal of cardiology**, v. 84, n. 2, p. 214–218, 15 jul. 1999.

MICHAELIS. **Moderno dicionário da Língua Portuguesa**. Disponível em: <<http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php>>.

MIKKOLA, T.; VIINIKKA, L.; YLIKORKALA, O. Administration of transdermal estrogen without progestin increases the capacity of plasma and serum to stimulate prostacyclin production in human vascular endothelial cells. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 1, p. 72–74, jan. 2000.

MILLER, V. M.; DUCKLES, S. P. Vascular actions of estrogens: functional implications. **Pharmacological reviews**, v. 60, n. 2, p. 210–41, 2008.

MILLER, V. M.; VANHOUTTE, P. M. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. **Am J Physiol**, v. 261, n. 4 Pt 2, p. R1022-7, out. 1991.

MIYACHI, M. Effects of resistance training on arterial stiffness: a meta-analysis. **British journal of sports medicine**, v. 47, n. 6, p. 1–6, abr. 2012.

MIYACHI, M.; KAWANO, H.; SUGAWARA, J.; TAKAHASHI, K.; HAYASHI, K.; YAMAZAKI, K.; TABATA, I.; TANAKA, H. Unfavorable effects of resistance training on central arterial compliance: a randomized intervention study. **Circulation**, v. 110, n. 18, p. 2858–63, 2 nov. 2004.

MOBINI FAR, H. R.; AGREN, G.; LINDQVIST, A.-S.; MARMENDAL, M.; FAHLKE, C.; THIBLIN, I. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 131, n. 2, p. 189–97, abr. 2007.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–42, jun. 1991.

MONTISCI, M.; EL MAZLOUM, R.; CECCHETTO, G.; TERRANOVA, C.; FERRARA, S. D.; THIENE, G.; BASSO, C. Anabolic androgenic steroids abuse and cardiac death in athletes: Morphological and toxicological findings in four fatal cases. **Forensic Science International**, v. 217, n. 1–3, p. e12–e17, 2012.

MOR, G.; ELIZA, M.; SONG, J.; WIITA, B.; CHEN, S.; NAFTOLIN, F. 17 α -Methyl testosterone is a competitive inhibitor of aromatase activity in Jar choriocarcinoma cells and macrophage-like THP-1 cells in culture. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, n. 1, p. 239–246, 2001.

MORAES, M. R.; BACURAU, R. F. P.; CASARINI, D. E.; JARA, Z. P.; RONCHI, F. A.; ALMEIDA, S. S.; HIGA, E. M. S.; PUDO, M. A.; ROSA, T. S.; HARO, A. S.; BARROS, C. C.; PESQUERO, J. B.; WÜRTELE, M.; ARAUJO, R. C. **Chronic Conventional Resistance Exercise Reduces Blood Pressure in Stage 1 Hypertensive Men** **Journal of Strength and Conditioning Research**, abr. 2012a. .

MORAES, M. R.; BACURAU, R. F. P.; SIMÕES, H. G.; CAMPBELL, C. S. G.; PUDO, M. A.; WASINSKI, F.; PESQUERO, J. B.; WÜRTELE, M.; ARAUJO, R. C. Effect of 12 weeks of resistance exercise on post-exercise hypotension in stage 1 hypertensive individuals. **Journal of Human Hypertension**, v. 26, n. 9, p. 533–539, 7 set. 2012b.

MOTA, M. M.; MESQUITA, T. R. R.; DA SILVA, T. L. T. B.; FONTES, M. T.; SANTOS, S. L.; DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI, L.; DE JESUS, I. C. G.; JÚNIOR, L. J. Q.; DE ANGELIS, K.; WICHI, R. B.; SANTOS, M. R. V. Endothelium adjustments to acute resistance exercise are intensity-dependent in healthy animals. **Life sciences**, v. 142, p. 86–91, 8 out. 2015.

MOTA, M. M.; SILVA, T. L. T. B. da; FONTES, M. T.; BARRETO, A. S.; ARAÚJO, J. E. dos S.; OLIVEIRA, A. C. C. de; WICHI, R. B.; SANTOS, M. R. V. Resistance exercise restores endothelial function and reduces blood pressure in type 1 diabetic

rats. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 103, n. 1, p. 25–32, jul. 2014.

MULLER, G.; MORAWIETZ, H. Nitric Oxide, NAD(P)H Oxidase, and Atherosclerosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 7, p. 1711–1731, 2009.

NAKAO, J.; CHANGE, W. C.; MUROTA, S. I.; ORIMO, H. Testosterone inhibits prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture. **Atherosclerosis**, v. 39, n. 2, p. 203–9, maio 1981.

NASCIMENTO, A.; DE LIMA, E.; BOECHAT, G.; MEYRELLES, S.; BISSOLI, N.; LENZ, D.; ENDRINGER, D.; DE ANDRADE, T. Testosterone induces apoptosis in cardiomyocytes by increasing proapoptotic signaling involving tumor necrosis factor- α and renin angiotensin system. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 11, p. 1–9, nov. 2015.

NASCIMENTO, A. M. do; LIMA, E. M. de; BRASIL, G. A.; CALIMAN, I. F.; SILVA, J. F. da; LEMOS, V. S.; ANDRADE, T. U. de; BISSOLI, N. S. Serca2a and Na⁺/Ca²⁺ exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 301, p. 22–30, 2016.

NAWATE, S.; FUKAO, M.; SAKUMA, I.; SOMA, T.; NAGAI, K.; TAKIKAWA, O.; MIWA, S.; KITABATAKE, A. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. **British journal of pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 178–89, jan. 2005.

NICKENIG, G.; STREHLOW, K.; WASSMANN, S.; BAUMER, A. T.; ALBORY, K.; SAUER, H.; BOHM, M. Differential Effects of Estrogen and Progesterone on AT1 Receptor Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation**, v. 102, n. 15, p. 1828–1833, 10 out. 2000.

NIESCHLAG, E.; VORONA, E. Mechanisms in Endocrinology: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: Effects on reproductive functions. **European Journal of Endocrinology**, v. 173, n. 2, p. R47–R58, 2015.

OBASANJO, I. O.; CLARKSON, T. B.; WEAVER, D. S. Effects of the anabolic steroid nandrolone decanoate on plasma lipids and coronary arteries of female cynomolgus macaques. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 45, n. 4, p. 463–8, abr. 1996.

OBERLANDER, J. G.; HENDERSON, L. P. The Strum und Drang of anabolic steroid use: angst, anxiety, and aggresion. **Trends Neuroscience**, v. 35, n. 6, p. 382–392, 2012a.

OBERLANDER, J. G.; HENDERSON, L. P. Corticotropin-Releasing Factor Modulation of Forebrain GABAergic Transmission has a Pivotal Role in the Expression of Anabolic Steroid-Induced Anxiety in the Female Mouse. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 6, p. 1483–1499, 2012b.

OBERLANDER, J. G.; PENATTI, C. a a; PORTER, D. M.; HENDERSON, L. P. The Buzz About Anabolic Androgenic Steroids: Electrophysiological Effects in Excitable Tissues. **Neuroendocrinology**, v. 96, n. 2, p. 141–151, 2012.

OLIVEIRA, P. W. C. **Metformina reduz disfunção vascular em ratas ovariectomizadas**. 2012. Dissertação (mestrado) - Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

OLIVEIRA, P. W. C.; DE SOUSA, G. J.; CALIMAN, I. F.; LAMAS, A. Z.; DE MEDEIROS, A. R. S.; DE ANDRADE, T. U.; DE ABREU, G. R.; DE FIGUEIREDO, S. G.; BISSOLI, N. S. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 275, p. 265–275, 2014.

ONAKOMAIYA, M. M.; HENDERSON, L. P. Mad men, women and steroid cocktails: a review of the impact of sex and other factors on anabolic androgenic steroids effects on affective behaviors. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 4, p. 549–69, mar. 2016.

ORGANIZATION, W.-W. H. **Physical activity**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/physical_activity/en/>. Acesso em: 1 jan. 2017.

ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. a. Gender, sex hormones, and vascular tone. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 2, p. R233-49, fev. 2004.

PADILLA, J.; SIMMONS, G.; BENDER, S.; ARCE-ESQUIVEL, A.; WHYTE, J.; LAUGHLIN, M. Vascular effects of exercise: endothelial adaptations beyond active muscle beds. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 26, n. 3, p. 132–45, 2011.

PAGONIS, T. A.; ANGELOPOULOS, N. V.; KOUKOULIS, G. N.; HADJICHRISTODOULOU, C. S. Psychiatric side effects induced by supraphysiological doses of combinations of anabolic steroids correlate to the severity of abuse. **European psychiatry: the journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 21, n. 8, p. 551–62, dez. 2006.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 11 jun. 1987.

PANG, Y.; DONG, J.; THOMAS, P. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 308, n. 10, p. E899-911, 15 maio 2015.

PANIAGUA, O.; BRYANT, M.; PANZA, J. Role of Endothelial Nitric Oxide in Shear Stress – Induced Vasodilation of Human Microvasculature. **Circulation**, v. 103, n. 13, p. 1752–1758, 2001.

PARK, K. M.; KIM, J. I.; AHN, Y.; BONVENTRE, A. J.; BONVENTRE, J. V. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52282–52292, 10 dez. 2004.

PASSOS, M. C. F.; GONÇALVES, M. C. **Regulation of insulin sensitivity by adiponectin and its receptors in response to physical exercise** *Hormone and Metabolic Research* © Georg Thieme Verlag KG, , 15 ago. 2014. .

PENATTI, C. A. A.; OBERLANDER, J. G.; DAVIS, M. C.; PORTER, D. M.; HENDERSON, L. P. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters activity and synaptic function in neuroendocrine control regions of the female mouse. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 4, p. 653–64, set. 2011.

PENATTI, C. A. A.; PORTER, D. M.; HENDERSON, L. P. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters neuronal function in the mammalian forebrain via androgen

receptor- and estrogen receptor-mediated mechanisms. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 40, p. 12484–96, 7 out. 2009.

PENNA, C.; TULLIO, F.; PERRELLI, M. G.; MORO, F.; ABBADESSA, G.; PICCIONE, F.; CARRIERO, V.; RACCA, S.; PAGLIARO, P. Ischemia/reperfusion injury is increased and cardioprotection by a postconditioning protocol is lost as cardiac hypertrophy develops in nandrolone treated rats. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, p. 409–420, 2011.

PEREZ-TORRES, I.; EL HAFIDI, M.; INFANTE, O.; BANOS, G. Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 86, n. 1–2, p. 25–35, 2008.

PERUSQUÍA, M.; STALLONE, J. N. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 298, n. 5, p. H1301-7, maio 2010.

PINNA, C.; BOLEGO, C.; SANVITO, P.; PELOSI, V.; BAETTA, R.; CORSINI, A.; GAION, R. M.; CIGNARELLA, A. Raloxifene Elicits Combined Rapid Vasorelaxation and Long-Term Anti-Inflammatory Actions in Rat Aorta. v. 319, n. 3, p. 1444–1451, 2006.

POLLOCK, M. L.; FRANKLIN, B. A.; BALADY, G. J.; CHAITMAN, B. L.; FLEG, J. L.; FLETCHER, B.; LIMACHER, M.; PIN, I. L.; STEIN, R. A.; WILLIAMS, M.; BAZZARRE, T. Resistance Exercise in Individuals With and Without Cardiovascular Disease: Benefits, Rationale, Safety, and Prescription: An Advisory From the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Associati. **Blood Pressure**, v. 8721, n. 71, p. 828–833, 2000.

POPE, H. G.; KANAYAMA, G.; ATHEY, A.; RYAN, E.; HUDSON, J. I.; BAGGISH, A. The lifetime prevalence of anabolic-androgenic steroid use and dependence in Americans: Current best estimates. **American Journal on Addictions**, v. 23, p. 371–377, 2014.

POPE, H. G.; KOURI, E. M.; HUDSON, J. I. Effects of supraphysiologic doses of testosterone on mood and aggression in normal men: a randomized controlled trial. **Archives of general psychiatry**, v. 57, p. 133-140-156, 2000.

POPE, H. G.; OLIVARDIA, R.; BOROWIECKI, J. J.; COHANE, G. H. The growing commercial value of the male body: A longitudinal survey of advertising in women's magazines. **Psychotherapy and Psychosomatics**, v. 70, n. 4, p. 189–192, 2001.

POPE, H. G.; OLIVARDIA, R.; GRUBER, A.; BOROWIECKI, J. Evolving ideals of male body image as seen through action toys. **International Journal of Eating Disorders**, v. 26, n. 1, p. 65–72, jul. 1999.

PUTTABYATAPPA, Y.; STALLONE, J. N.; ERGUL, A.; EL-REMESSY, A. B.; KUMAR, S.; BLACK, S.; JOHNSON, M.; OWEN, M. P.; WHITE, R. E. Peroxynitrite mediates testosterone-induced vasodilation of microvascular resistance vessels. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 345, n. 1, p. 7–14, abr. 2013.

RAINER, Q.; SPEZIALI, S.; RUBINO, T.; DOMINGUEZ-LOPEZ, S.; BAMBICO, F. R.;

GOBBI, G.; PAROLARO, D. Chronic nandrolone decanoate exposure during adolescence affects emotional behavior and monoaminergic neurotransmission in adulthood. **Neuropharmacology**, v. 83, p. 79–88, 2014.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; THANGAVEL, J.; NISHIGAKI, Y.; SAKTHISEKARAN, D.; SETHI, G.; NISHIGAKI, I. The vascular endothelium and human diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1057–1069, 2013.

RAMOS, J. S.; DALLECK, L. C.; TJONNA, A. E.; BEETHAM, K. S.; COOMBES, J. S. **The Impact of High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training on Vascular Function: a Systematic Review and Meta-Analysis** *Sports Medicine*, 15 maio 2015. .

RAY, R.; SHAH, A. M. NADPH oxidase and endothelial cell function. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 109, n. 3, p. 217–26, set. 2005.

RICCI, L.; TR, M.; MELLONI JR, R. Adolescent Anabolic/Androgenic Steroids: Aggression and Anxiety During Exposure Predict Behavioral Responding During Withdrawal in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Hormones and Behavior**, v. 64, n. 5, p. 770–780, 2013.

RIEZZO, I.; TURILLAZZI, E.; BELLO, S.; CANTATORE, S.; CERRETANI, D.; DI PAOLO, M.; FIASCHI, A. I.; FRATI, P.; NERI, M.; PEDRETTI, M.; FINESCHI, V. Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF- α mediated apoptosis in the kidneys of CD1 treated mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 280, n. 1, p. 97–106, 1 out. 2014.

ROCHA, F. L.; CARMO, E. C.; ROQUE, F. R.; HASHIMOTO, N. Y.; ROSSONI, L. V.; FRIMM, C.; ANÉAS, I.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, J. E.; OLIVEIRA, E. M. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 293, p. H3575–H3583, 2007.

RODRIGUES, B.; LIRA, F. S.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; ROCHA, J. A.; CAPERUTO, E. C.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Role of exercise training on autonomic changes and inflammatory profile induced by myocardial infarction. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

ROS,CA, A. E.; STOIAN, I.; BADIU, C.; GAMAN, L.; POPESCU, B. O.; IOSIF, L.; MIRICA, R.; TIVIG, I. C.; STANCU, C. S.; CĂRUNTU, C.; VOICULESCU, S. E.; ZĂGREAN, L. Impact of chronic administration of anabolic androgenic steroids and taurine on blood pressure in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 6, p. 1–8, 2016.

ROUVER, W. N.; DELGADO, N. T. B.; MENEZES, J. B.; SANTOS, R. L.; MOYSES, M. R. Testosterone Replacement Therapy Prevents Alterations of Coronary Vascular Reactivity Caused by Hormone Deficiency Induced by Castration. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0137111, 31 ago. 2015.

RUEHLMANN, D. O.; STEINERT, J. R.; VALVERDE, M. A.; JACOB, R.; MANN, G. E. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 7, p.

613–619, maio 1998.

RUZICKA, L.; WETTSTEIN, A. Sexualhormone VII. Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten-3-on-17-ol). **Helvetica Chimica Acta**, v. 18, n. 1, p. 1264–1275, 1935.

RYAN, K. J. Biological aromatization of steroids. **The Journal of biological chemistry**, v. 234, n. 2, p. 268–272, fev. 1959.

SAARTOK, T.; DAHLBERG, E.; GUSTAFSSON, J. A. Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: Comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. **Endocrinology**, v. 114, n. 6, p. 2100–2106, jun. 1984.

SADER, M. A.; GRIFFITHS, K. A.; MCCREDIE, R. J.; HANDELSMAN, D. J.; CELERMAJER, D. S. Androgenic anabolic steroids and arterial structure and function in male bodybuilders. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, n. 1, p. 224–30, jan. 2001.

SADER, M. a; CELERMAJER, D. S. Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. **Cardiovascular research**, v. 53, n. 3, p. 597–604, 15 fev. 2002.

SAGOE, D.; MOLDE, H.; ANDREASSEN, C. S.; TORSHEIM, T.; PALLESEN, S. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Annals of epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 383–98, maio 2014.

SAHRAIAN, M. A.; MOTTAMED, M.; AZIMI, A. R.; MOGHIMI, B. Androgen-induced cerebral venous sinus thrombosis in a young body builder: case report. **BMC neurology**, v. 4, p. 22, 2004.

SANDOO, A.; VAN ZANTEN, J. J. C. S. V.; METSIOS, G. S.; CARROLL, D.; KITAS, G. D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The open cardiovascular medicine journal**, v. 4, p. 302–12, jan. 2010.

SANDOW, S. L.; HILL, C. E. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. **Circulation research**, v. 86, n. 3, p. 341–346, 18 fev. 2000.

SATO, S. M.; SCHULZ, K. M.; SISK, C. L.; WOOD, R. I. Adolescents and androgens, receptors and rewards. **Hormones and Behavior**, v. 53, n. 5, p. 647–658, maio 2008.

SELLES, J.; POLINI, N.; ALVAREZ, C.; MASSHEIMER, V. Nongenomic action of progesterone in rat aorta: Role of nitric oxide and prostaglandins. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 5, p. 431–436, maio 2002.

SEVERO, C. B.; RIBEIRO, J. P.; UMPIERRE, D.; DA SILVEIRA, A. D.; PADILHA, M. C.; DE AQUINO NETO, F. R.; STEIN, R. Increased atherothrombotic markers and endothelial dysfunction in steroid users. **European journal of preventive cardiology**, v. 20, n. 2, p. 195–201, abr. 2013.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1355–90, set. 2001.

SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 915–22, maio 2010.

SHIMOKAWA, H.; YASUTAKE, H.; FUJII, K.; OWADA, M. K.; NAKAIKE, R.; FUKUMOTO, Y.; TAKAYANAGI, T.; NAGAO, T.; EGASHIRA, K.; FUJISHIMA, M.; TAKESHITA, A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 703–11, nov. 1996.

SHUTO, H.; TOMINAGA, K.; YAMAUCHI, A.; IKEDA, M.; KUSABA, K.; MITSUNAGA, D.; HIRABARA, Y.; EGAWA, T.; TAKANO, Y.; KATAOKA, Y. The statins fluvastatin and pravastatin exert anti-flushing effects by improving vasomotor dysfunction through nitric oxide-mediated mechanisms in ovariectomized animals. **European journal of pharmacology**, v. 651, n. 1–3, p. 234–9, 25 jan. 2011.

SIASOS, G.; ATHANASIOU, D.; TERZIS, G.; STASINAKI, A.; TOURIKIS, P.; DIMITROPOULOS, E.; TSOUROULAS, S.; GOULIOPOULOS, N.; OIKONOMOU, E.; ZAROMITIDOU, M.; MOUROUZIS, K.; TSALAMANDRIS, S.; KOKKOU, E.; STEFANADIS, C. I.; TOUSOULIS, D. Effects of Aerobic and Resistance Exercise on Vascular Function. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 10, p. A292, mar. 2015.

SILVA, P. R. P. Da; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235–243, 2002.

SILVA, R. R. da. **Efeito da administração crônica do decanoato de testosterona e do decanoato de nandrolona sobre parâmetros laboratoriais, peso e repetição máxima em ratos wistar submetidos ao treinamento contra resistido**. 2013. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biociências e Reabilitação, Centro Universitário Metodista, do IPA, 2013.

SIMONCINI, T.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; BRAZIL, D. P.; LEY, K.; CHIN, W. W.; LIAO, J. K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 538–41, 28 set. 2000.

SIMONCINI, T.; MANNELLA, P.; FORNARI, L.; CARUSO, A.; WILLIS, M. Y.; GARIBALDI, S.; BALDACCI, C.; GENAZZANI, A. R. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5745–5756, dez. 2004.

SIRIANNI, R.; CAPPARELLI, C.; CHIMENTO, A.; PANZA, S.; CATALANO, S.; LANZINO, M.; PEZZI, V.; ANDÒ, S. Nandrolone and stanozolol upregulate aromatase expression and further increase IGF-I-dependent effects on MCF-7 breast cancer cell proliferation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 363, n. 1–2, p. 100–110, 2012.

SKOGASTIERNA, C.; HOTZEN, M.; RANE, A.; EKSTRÖM, L. A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress. **European journal of preventive cardiology**, v. 21, n. 8, p. 1049–54, ago. 2014.

STRICKER, P. R. **Other ergogenic agents** *Clinics in Sports Medicine*, 1998. .

SU, C. F.; YANG, F. L.; CHEN, H. I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase

attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 4, p. 339–46, abr. 2007.

SU, T. P.; PAGLIARO, M.; SCHMIDT, P. J.; PICKAR, D.; WOLKOWITZ, O.; RUBINOW, D. R. Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 269, p. 2760–2764, 1993.

SUN, M.; SHEN, W.; ZHONG, M.; WU, P.; CHEN, H.; LU, A. Nandrolone attenuates aortic adaptation to exercise in rats. **Cardiovascular Research**, v. 97, p. 686–695, 2013.

TAGARAKIS, C. V; BLOCH, W.; HARTMANN, G.; HOLLMANN, W.; ADDICKS, K. Anabolic steroids impair the exercise-induced growth of the cardiac capillary bed. **International journal of sports medicine**, v. 21, n. 6, p. 412–8, ago. 2000.

TAMURA, K.; YAMAGUCHI, K.; KOGO, H. 17Beta-estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo. **Life sciences**, v. 66, n. 17, p. PL 259-64, mar. 2000.

TANNO, A. P.; CUNHA, T. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Relação entre Exercício Físico de Alta Intensidade e o Lactato Sangüíneo, em ratos. **Saúde em Revista**, v. 8, n. 20, p. 23–29, 2006.

TATA, J. R. One hundred years of hormones. **EMBO reports**, v. 6, n. 6, p. 490–6, jun. 2005.

TAYLOR, S. G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends in pharmacological sciences**, v. 9, n. 8, p. 272–4, ago. 1988.

TEP-AREENAN, P.; KENDALL, D. a; RANDALL, M. D. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 735–40, fev. 2002.

THEIN, L. A.; THEIN, J. M.; LANDRY, G. L. Ergogenic aids. **Physical therapy**, v. 75, n. 5, p. 426–39, maio 1995.

THIBLIN, I.; PETERSSON, A. **Pharmacoepidemiology of anabolic androgenic steroids: A review** *Fundamental and Clinical Pharmacology*, fev. 2005. .

THOMPSON, D.; KARPE, F.; LAFONTAN, M.; FRAYN, K. Physical Activity and Exercise in the Regulation of Human Adipose Tissue Physiology. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 157–191, 2012.

TOOT, J. D.; REHO, J. J.; NOVAK, J.; DUNPHY, G.; ELY, D. L.; RAMIREZ, R. J. Testosterone increases myogenic reactivity of second-order mesenteric arteries in both defective and normal androgen receptor adult male rats. **Gender medicine**, v. 8, n. 1, p. 40–52, fev. 2011.

TORRES-ESTAY, V.; CARRENO, D. V.; SAN FRANCISCO, I. F.; SOTOMAYOR, P.; GODOY, A. S.; SMITH, G. J. Androgen receptor in human endothelial cells. **Journal of Endocrinology**, v. 224, n. 3, p. R131–R137, mar. 2015.

TOSTES, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. **Effects of**

estrogen on the vascular system**Brazilian Journal of Medical and Biological Research****Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, , set. 2003. .

TRENTON, A. J.; CURRIER, G. W. Behavioural manifestations of anabolic steroid use. **CNS drugs**, v. 19, n. 7, p. 571–95, 2005.

UGGERE DE ANDRADE, T.; LOIOLA, L. Z.; ALCURE, S. M. N.; MEDEIROS, A. R. S.; SANTOS, M. C. L. F. S.; MOYSÉS, M. R.; ABREU, G. R. de; LENZ, D.; BISSOLI, N. S. Role of the renin-angiotensin system in the nandrolone-decanoate-induced attenuation of the Bezold-Jarisch reflex. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 89, p. 891–897, 24 nov. 2011.

UMPIERRE, D.; STEIN, R. Hemodynamic and vascular effects of resistance training: implications for cardiovascular disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 89, n. 4, p. 256–262, out. 2007.

URHAUSEN, A.; ALBERS, T.; KINDERMANN, W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? **Heart (British Cardiac Society)**, v. 90, p. 496–501, 2004.

VALVERDE, M. A.; ROJAS, P.; AMIGO, J.; HOLLENBERG, N. K. **Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by Estradiol binding to the beta subunit.****Current Hypertension Reports**, 17 set. 2000. .

VANBERG, P.; ATAR, D. **Androgenic anabolic steroid abuse and the cardiovascular system****Handbook of Experimental Pharmacology**, 2010. .

VANHOUTTE, P.; FELETOUM, M.; TADDEIM, S. Endothelium- dependent contractions in hypertension. **Br J Pharmacol**, v. 144, n. 4, p. 449–458, fev. 2005.

VERSARI, D.; DAGHINI, E.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. **Diabetes care**, v. 32 Suppl 2, p. S314-21, nov. 2009.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 35, n. 11, p. 1389–94, nov. 2002.

WADE, N. Anabolic Steroids: Doctors Denounce Them, but Athletes Aren't Listening. **Science (New York, N.Y.)**, v. 176, n. 4042, p. 1399–403, 30 jun. 1972.

WAKASUGI, M.; NOGUCHI, T.; KAZAMA, Y. I.; KANEMARU, Y.; ONAYA, T. The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI₂) by vascular tissues. **Prostaglandins**, v. 37, n. 4, p. 401–10, abr. 1989.

WANG, L.; SZKLO, M.; FOLSOM, A. R.; COOK, N. R.; GAPSTUR, S. M.; OUYANG, P. Endogenous sex hormones, blood pressure change, and risk of hypertension in postmenopausal women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 1, p. 228–234, set. 2012.

WASSMANN, S.; BÄUMER, A. T.; STREHLOW, K.; VAN EICKELS, M.; GROHÉ, C.; AHLBORY, K.; RÖSEN, R.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 103, n. 3, p. 435–441, 23 jan. 2001.

WEBB, C. M.; GHATEI, M. A.; MCNEILL, J. G.; COLLINS, P. **17beta-estradiol**

decreases endothelin-1 levels in the coronary circulation of postmenopausal women with coronary artery disease. *Circulation*, 3 out. 2000. .

WELTER, B. H.; HANSEN, E. L.; SANER, K. J.; WEI, Y.; PRICE, T. M. Membrane-bound progesterone receptor expression in human aortic endothelial cells. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 51, n. 8, p. 1049–55, ago. 2003.

WHITE, J. P.; BALTGALVIS, K. A.; SATO, S.; WILSON, L. B.; CARSON, J. A. Effect of nandrolone decanoate administration on recovery from bupivacaine-induced muscle injury. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 107, n. 5, p. 1420–30, nov. 2009.

WIDMER, R. J.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. **Global cardiology science & practice**, v. 2014, n. 3, p. 291–308, 2014.

WIERNAN, M. E. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. **Advances in physiology education**, v. 31, n. 1, p. 26–33, mar. 2007.

WILLIAMS, M. A.; HASKELL, W. L.; ADES, P. A.; AMSTERDAM, E. A.; BITTNER, V.; FRANKLIN, B. A.; GULANICK, M.; LAING, S. T.; STEWART, K. J. **Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: A scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism** *Circulation*, 9 jul. 2007. .

WILLIAMSON, D. J. Anabolic steroid use among students at a British college of technology. **British journal of sports medicine**, v. 27, n. 3, p. 200–1, set. 1993.

WINTERS, S. J. Androgens: endocrine physiology and pharmacology. **NIDA research monograph**, v. 102, p. 113–130, 1990.

WONG, C. M.; YAO, X.; AU, C. L.; TSANG, S. Y.; FUNG, K. P.; LAHER, I.; VANHOUTTE, P. M.; HUANG, Y. Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats. **Vascular pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 290–8, maio 2006.

WOODMAN, O. L.; WONGSAWATKUL, O.; SOBEY, C. G. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K⁺ channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 1–2, p. 34–40, 2000.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY - WADA. **2017 Prohibited List**. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/prohibited-list>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

WRIGHT, D. H.; ABRAN, D.; BHATTACHARYA, M.; HOU, X.; BERNIER, S. G.; BOUAYAD, A.; FOURON, J. C.; VAZQUEZ-TELLO, A.; BEAUCHAMP, M. H.; CLYMAN, R. I.; PERI, K.; VARMA, D. R.; CHEMTOB, S. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, n. 5, p. R1343–60, nov. 2001.

WU, F. C. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1289–92, jul. 1997.

WU, F. C. W.; VON ECKARDSTEIN, A. **Androgens and coronary artery disease** *Endocrine Reviews*, abr. 2003. .

WU, F.; TYML, K.; WILSON, J. X. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. **J Cell Physiol**, v. 217, n. 1, p. 207–214, 2008.

XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 6954–8, 24 jun. 1997.

XING, D.; NOZELL, S.; CHEN, Y.-F.; HAGE, F.; OPARIL, S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 3, p. 289–95, mar. 2009.

YESALIS, C. E.; BAHRKE, M. S. Doping among adolescent athletes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 25–35, mar. 2000.

YESALIS, C. E.; KENNEDY, N. J.; KOPSTEIN, A. N.; BAHRKE, M. S. Anabolic-androgenic steroid use in the United States. **JAMA**, v. 270, n. 10, p. 1217–21, 8 set. 1993.

YIN, F. C.; SPURGEON, H. A.; RAKUSAN, K.; WEISFELDT, M. L.; LAKATTA, E. G. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **The American journal of physiology**, v. 243, n. 6, p. H941–7, dez. 1982.

YU, J.; AKISHITA, M.; ETO, M.; KOIZUMI, H.; HASHIMOTO, R.; OGAWA, S.; TANAKA, K.; OUCHI, Y.; OKABE, T. Src kinase-mediates androgen receptor-dependent non-genomic activation of signaling cascade leading to endothelial nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 424, n. 3, p. 538–543, 2012.

YU, J.; AKISHITA, M.; ETO, M.; OGAWA, S.; SON, B. K.; KATO, S.; OUCHI, Y.; OKABE, T. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: Role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1822–1828, abr. 2010.

YUE, P.; CHATTERJEE, K.; BEALE, C.; POOLE-WILSON, P. A.; COLLINS, P. Testosterone Relaxes Rabbit Coronary Arteries and Aorta. **Circulation**, v. 91, n. 4, 1995.

YUNG, L. M.; WONG, W. T.; TIAN, X. Y.; LEUNG, F. P.; YUNG, L. H.; CHEN, Z. Y.; YAO, X.; LAU, C. W.; HUANG, Y. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17437, jan. 2011.

ZOTTI, M.; TUCCI, P.; COLAIANNA, M.; MORGESE, M. G.; MHILLAJ, E.; SCHIAVONE, S.; SCACCIANOCE, S.; CUOMO, V.; TRABACE, L. Chronic nandrolone administration induces dysfunction of the reward pathway in rats. **Steroids**, v. 79, p. 7–13, 2014.

8. ANEXOS

8.1 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO RELACIONADO AO TEMA DA TESE

Steroids 120 (2017) 7–18



Contents lists available at ScienceDirect

Steroids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids



Long-term treatment with Nandrolone Decanoate impairs mesenteric vascular relaxation in both sedentary and exercised female rats



Izabela F. Caliman^{a,*}, Cristian S. Bernabe^{b,c}, Antônio F. de Melo Jr.^a, Gislândia A. Brasil^a,
Andrews M. do Nascimento^a, Ewelyne M. de Lima^{a,d}, Suely G. Figueiredo^a, Tadeu U. de Andrade^d, Nazaré S. Bissoli^a

^a Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^b Department of Anatomy & Cell Biology, Paul and Carole Stark Neurosciences Research Institute, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA

^c Program in Medical Neurosciences, Paul and Carole Stark Neurosciences Research Institute, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA

^d Department of Pharmaceutical Sciences, University of Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2016

Received in revised form 9 December 2016

Accepted 1 February 2017

Available online 10 February 2017

Keywords:

Nandrolone Decanoate
Anabolic Androgenic Steroids
Nitric Oxide
Vascular dysfunction
Exercise training

ABSTRACT

Nandrolone Decanoate (ND) is an Anabolic Androgenic Steroid (AAS) that under abusive regimen can lead to multiple physiological adverse effects. Studies of AAS-mediated cardiovascular (CV) alterations were mostly taken from male subjects, even though women are also susceptible to the effects of AAS and gender-specific differences in susceptibility to vascular diseases exist. Here we investigate ND-induced vascular reactivity alterations in both sedentary and exercised female rats and whether these alterations depend on endothelium-derived factors. We show that chronic exposure of female Wistar rats to ND (20 mg/Kg/week for 4 weeks) impaired the vascular mesenteric bed (MVB) reactivity to vasodilator (acetylcholine) agonist. The endothelium-dependent Nitric Oxide (NO) component was reduced in ND-treated rats, whereas neither the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) component nor prostanooids were altered in the MVBs. Endothelial dysfunction observed in ND-treated rats was associated with decreased eNOS (Ser¹¹⁷⁷) and Akt (Ser⁴⁷³) phosphorylation sites and upregulation of iNOS and NADPH oxidase expression. Exercise training by weight lifting in water did not improve the vascular alterations induced by ND treatment. ND treatment also significantly reduced the serum levels of estradiol in females, overriding its CV protective effect. These results help uncover the role of ND modulating endothelial function in the setting of CV disease caused by the abuse of AAS in females. If this translates to humans, young women abusing AAS can potentially lose the cardio protective effect rendered by estrogen and be more susceptible to CV alterations.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Originally developed for clinical purposes [1], Anabolic Androgenic Steroids (AAS) have been illicitly used for enhancement of physical appearance and performance and became a health concern [2]. Regardless of strong evidences supporting the physical, psychological, and behavioral negative effects due both acute and chronic AAS abuse [3,4], the AAS self-administration by professional athletes has spread into the general population in the past decades [3], being particularly more common within adolescents and young adults [5,6]. Although AAS abusers are greater in men

rather than in women, studies point out that a few hundreds of thousands of current AAS users are girls and young women [6–8].

The great majority of AAS adverse effects are permanent [3,9] and the undesirable consequences of steroids abuse have a particular detrimental effect in women and adolescents [4,10]. For instance, the virilization and premature epiphyseal closure are likely irreversible in those groups [11]. Additional relevance stands for the disruption of reproductive and neuroendocrine function in females [12,13], engendering additional concerns of the effects of exposure to high levels of synthetic steroids in women.

Generally, doses of abuse of AAS appear to produce a range of negative cardiovascular effects, such as cardiomegaly, arrhythmias, myocardium infarction, hypertrophy, hypertension, dysfunction in tonic cardiac autonomic regulation, and increased muscle sympathetic nerve activity [14–16]. Additionally, AAS nandrolone, one of the most frequently consumed AAS among abusers [17], has also

* Corresponding author at: Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Vitória, ES 29042-755, Brazil.

E-mail address: icaliman12@gmail.com (I.F. Caliman).

been associated with the development of a cardiac pro-inflammatory state by increasing both inflammatory cytokines and local angiotensin-converting enzyme [14,18].

It is well known that the endothelium plays a crucial role in the control of vascular function by the release of several potent vasoactive factors that control vascular tone, such as Nitric Oxide (NO), endothelium derived hyperpolarizing factors (EDHFs) and Prostaglandins (PGs) [19]. Alterations in vascular reactivity are frequently a consequence of a dysfunctional endothelium, and these changes may contribute to the beginning and development of cardiovascular diseases [20].

Even though the increased cardiovascular risks associated with AAS abuse are well recognized, the effect of supra-physiological doses of androgens in the vasculature remains poorly understood. Prior studies suggest that AAS can cause an impairment of endothelial function and vascular reactivity in both humans and animals [21–23]. Mechanistically, the disruption of the endothelial function seems likely to be involved with increased levels of androgens and their impact on the function of NO, PGI_2 , and EDHF [16,24–26]. Furthermore, some reports have shown that AAS nandrolone attenuates the physiological vascular adaptations promoted by aerobic physical exercise [25,27]. Interestingly, however, most of the AAS users are practitioners of resistance exercise [28], a moderate to high intensity physical strength activity that relies more on the anaerobic metabolic pathway [29]. Despite of some reports showing aerobic exercises leading to vascular adaptations that ultimately improve the arterial function [30,31], resistance training has been reported to impair, improve or not affect vascular function [32–34]. Therefore, determining possible resistance exercise-induced alterations in the vascular reactivity of ND-treated animals is particularly important.

Evidences reported in the literature showing the effects of AAS on the vasculature were mostly conducted in males, yet the results remain elusive [25,35,36]. In addition to that, sex differences in the regulation of vascular homeostasis have been reported by several studies [37,38] and support the idea that AAS vascular effects could be sex-specific, suggesting that conclusions drawn from studies conducted in males should not be extrapolated to females. Despite of comprehensive evidences indicating the cardio protective effects of estrogen on vascular endothelial function and vascular reactivity [39,40], only a few studies describing AAS effects on vessels and vascular function have been performed in females [41,42]. Moreover, the role of endothelium and of the different components of endothelium-dependent dilatation were not investigated in those studies and it remains unclear whether AAS can cause vascular dysfunction in females.

Therefore, we performed this study to investigate both the isolated and combined effects of high-dose AAS-nandrolone and exercise training on vascular reactivity in mesenteric beds from female rats and the involvement of some key endothelial factors in the vascular response. Because we observed that AAS-nandrolone treatment reduced estrogen levels, we also sought to compare the vascular reactivity profiles between ovariectomized (an estrogen deficiency model) and ND treated female rats. We further hypothesize that high doses of AAS-nandrolone can lead to vascular dysfunction induced by alterations in the endothelium-derived vasorelaxant factors pathways in female rats.

2. Materials and methods

2.1. General procedures

2.1.1. Animals

All experimental procedures were performed in Wistar female rats weighting from 180 to 200 g provided by the university

facility. The animals were housed individually in plastic cages and maintained under standard laboratory conditions (22 °C; 12/12 light–dark cycle; lights on at 7:00AM). Water and food were available *ad libitum*. Animal care procedures were conducted in accordance with the biomedical research guidelines for the care and use of laboratory animals, as stated by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The experimental protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Espirito Santo (protocol number 031/2012).

2.1.2. Measurement of food intake, weight gain and adiposity index

During the study, daily food intake and body weight were measured every morning. For each rat, the amount of daily food intake was determined by subtracting the amount of food remaining from the previous measurement. At the end of the experimental protocol, the animals were sacrificed and the adipose tissue fat pads were then dissected and weighed. Total body fat was measured as the sum of the following individual fat pad weights: gonadal fat + retroperitoneal fat + visceral fat. The adiposity index was calculated as $(\text{total body fat}/\text{final BW}) \times 100$ [43].

2.1.3. Estrous cycle determination

Daily vaginal smears were taken from each female rat as previously described [44] to confirm whether their estrous cycles were proceeding normally [(i) estrus, (ii) metaestrus, (iii) diestrus, and (iv) proestrus]. The vaginal epithelial cells were examined via a microscope for at least 7 consecutive days before the experiment. The swabs were performed between 8:00 and 10:00 A.M. to maintain consistency. We standardized the experimental protocols when the animals that did not receive ND were in proestrus phase to avoid any influences caused by the hormonal variation at different phases of the estrous cycle [45] in the parameters studied below.

2.1.4. Hormone levels

Blood samples were collected on the day of the vascular reactivity experiments by arterial puncture before isolating the Mesenteric Vascular Beds. Estradiol and testosterone levels were determined in the serum using commercially available ELISA kits (DRG International Inc., Springfield, NJ, USA), according to the manufacturer's guidelines. All the samples were measured in duplicate.

2.1.5. Vascular reactivity studies in the perfused isolated mesenteric vascular bed (MVB)

The mesenteric vascular beds (MVBs) were isolated as described by us previously [44,46]. Briefly, the rats were anesthetized with ketamine and xylazine (90 and 10 mg/kg, i.p., respectively), the abdominal cavity was exposed, and the superior mesenteric artery was dissected and cannulated with a polyethylene catheter. The MVB was excised from the intestinal loops, placed in a chamber and the preparation was perfused with oxygenated (95% O_2 – 5% CO_2) Krebs' solution [(in mM) 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.6 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.17 $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 14.9 NaHCO_3 , 1.18 KH_2PO_4 , 0.026 EDTA, and 11.1 glucose, pH 7.4] at a constant flow rate of 4 mL/min and maintained at 37 °C. The MVBs were perfused for 30 min for the stabilization of the basal perfusion pressure. Changes in the perfusion pressure, which reflect peripheral resistance, were measured with a pressure transducer (Spectramed P23XL) connected to an acquisition system (MP100A, BIOPAC System, Inc., Santa Barbara, USA). After the stabilization period, the MVB was constricted by Krebs' solution containing NE capable of increasing the basal perfusion pressure by 90–120 mmHg. After establishing a steady level of contraction, dose-response curves were obtained by bolus injections (0.1 ml) of acetylcholine (ACh) (1.68×10^{-10} to 1.68×10^{-2} M) into the perfusion solutions of

the MVB preparations. The dose-response curves were performed initially in each MVB without any inhibitors. To evaluate the role of endothelium-derived vasoactive factors in the vascular responses, 100 μ M N^G-nitro-L-arginine methyl ester – L-NAME (a nonspecific NOS inhibitor), 100 μ M aminoguanidine – AG (an inducible NO synthase (iNOS) inhibitor) and 2.8 μ M indomethacin – INDO (a cyclooxygenase (COX) inhibitor) plus 100 μ M L-NAME were added to the Krebs' solution 30 min prior to the vasoactive agent [46,47]. The vasodilator response was calculated as percentage of reduction in the perfusion pressure induced by ACh after NE-induced contraction, according to the following equation: Relaxation (%) = $100 \times (P2 - P3) / (P2 - P1)$, in which (P1) is the basal perfusion pressure, (P2) is the basal perfusion pressure after NE contraction and, (P3) the reduction on pressure caused by ACh administration.

2.2. Experiment 1: Effects of Nandrolone Decanoate on sedentary and exercised intact-female rats

The animals were randomly distributed in 4 experimental groups ($n = 8$ animals per group): Vehicle-sedentary group (VEH + SED), Nandrolone Decanoate (ND)-sedentary group (ND + SED), Vehicle-exercise group (VEH + EXC), and ND-exercise group (ND + EXC). The animals received intramuscular injections (i.m.) of ND (10 mg/Kg per injection, Deca Durabolin®, Organon Inc, São Paulo, SP, Brazil) or vehicle (peanut oil with benzyl alcohol, 90:10 v/v) twice a week during 4 weeks. The ND dosage was chosen based on previous reports and is comparable with a dose frequently used by AAS abusers [14,25]. Vehicle or ND injections initiated at the same time of the resistance training protocol and lasted 28 days.

2.2.1. Exercise training

A program of exercise training was adapted from a previously described method [48]. Before enduring the training protocol, all the animals were adapted to water for five consecutive days. The adaptation consisted by placing the animals in shallow water (31 ± 1 °C, 60 min) in cylindrical tanks (25 cm diameter \times 50 cm depth). The exercised groups performed two sets of jumps in water, five times a week, during 4 weeks. In the first set of exercise, the animals were trained to jump in the water for 6 min (alternation of 30-s of exercise followed by 30-s of resting periods) with an overload of 50% of their body mass attached to a vest. After a 9-min recovery interval, the rats were submitted to the second set of exercise for 12 min (alternation of 60-s of exercise followed by 30-s of resting periods) carrying loads of 30% of their body mass. The anaerobic capacity was evaluated by lactate levels in blood samples (25 μ L) which were collected from rats' tails distal extremity nine minutes after the second set of exercise. The lactate concentrations were determined with a lactate analyzer (BM-Lactate® strips and Accutrend® Lactate monitor; Roche, São Paulo, Brazil) and the exercise was considered anaerobic for lactate values higher than 7.0 mmol/L. The anaerobic threshold (or blood lactate threshold) was defined as the break point in the blood lactate vs workload curve during incremental exercise and is thought to be an important indicator of endurance exercise capacity in humans [49] and it's been adapted successfully in rodents by Voltarelli and cols. [48].

2.2.2. Western blot

Western blotting was performed as previously described by us [44]. Mesenteric arteries (first- to fourth- order branches) were dissected free of surrounding adipose tissue, homogenized and centrifuged at 3000g for 15 min (4 °C). The protein lysates (50 μ g) were separated by 7.5% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with either

primary monoclonal or polyclonal antibodies (anti-eNOS, 1:500 BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA; anti-phosphorylated-eNOS¹¹⁷⁷, 1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA; anti-iNOS, 1:500, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA; anti-Akt, 1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA; anti-phosphorylated-Ser⁴⁷³ Akt, 1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA; anti-gp91^{phox}, 1:1000, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA; anti- β -actin 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) and subsequently with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Immunoreactive bands were detected using an enhanced horseradish peroxidase/luminal chemiluminescence system (ECL Prime, Amersham International, Little Chalfont, UK) and film (Hyperfilm ECL International). Images were analyzed and quantified by densitometry (ImageJ software) and all data were normalized to β -actin levels (loading control). The data are from five independent experiments and are expressed as percentage of arbitrary units in relation to the VEH + SED group.

Forty-eight hours after completing the program of exercise training and the measurement of food intake and weight gain, the hormone levels, vascular reactivity studies in the perfused isolated MVB and western blot analysis were carried out as described in earlier sessions.

2.3. Experiment 2: Comparing the vascular reactivity profiles between females submitted to estrogen-deficiency animal model and chronic ND treatment

Female rats were randomly distributed into 3 experimental groups ($n = 8$ animals per group): Sham vehicle-treated (SHAM), Sham ND-treated (SHAM + ND), and ovariectomized vehicle-treated (OVX). The ovariectomy surgery was performed under general anesthesia with an intraperitoneal injection (i.p.) of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). A bilateral muscle wall incision was made, and both the ovaries and oviduct were exteriorized. A sterile silk ligature was placed around the oviducts and part of each oviduct and the ovaries were removed. The remaining tissue was returned into the peritoneal cavity and the incisions were sutured. The sham-operated groups (SHAM and SHAM + ND) underwent the same procedure without removing the ovaries.

Dosage and administration of ND/vehicle were the same as described in experiment 1 and the measurement of food intake and weight gain, hormone levels, and vascular reactivity studies in the perfused isolated MVB were carried out as described in previous sessions.

2.4. Statistical analysis

The results are expressed as means \pm standard error of mean (SEM). Statistics and graphs were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). For each dose-response curve, the sensitivity to the agonist was calculated by nonlinear regression analysis as the pD_2 [$-\log(EC_{50})$]. To compare the effects of the inhibitors on the vasodilator responses, some of the results are expressed as area under the dose-response curve (AUC) or differences in the area under the dose-response curve (dAUC) before and during the specific inhibitor for all experimental groups. The AUCs and dAUCs were calculated from individual curve plots, being AUC expressed as absolute values that indicate the magnitude of the involvement of a pathway and dAUC expressed as percentages (%) that shows the participation of the mechanism relative to the global response. Each dependent variable was analyzed using a regular or repeated measures one- or two-way ANOVA. In the presence of significant main effects, post hoc comparisons were conducted using Fisher's test. Unpaired *t*-test was used for comparing blood lactate concentrations in experiment 1 and

ovaries weight in experiment 2. The confidence level for significance in all tests was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1: Effects of Nandrolone Decanoate on vascular reactivity of sedentary and exercised female rats

3.1.1. Effects of ND treatment on animal characteristics and circulating hormone levels in sedentary and exercised female rats

Table 1 displays the characteristics, body weight, organs weight-to-tibia length (TL) ratio and sexual hormone levels of the experimental animals. Two way ANOVA showed that only ND treatment, but not physical exercise, increased the weight gain of female rats ($F_{(1,28)} = 21.31$, $P < 0.001$), without any interaction between these factors. Despite the higher final body weight in ND treated animals, no difference was observed in the food intake amongst all groups. When compared to the VEH-treated animals, ND treatment increased the uterine weight-TL ratio ($F_{(1,28)} = 18.77$, $P < 0.001$) but reduced the ovaries weight-TL ratio ($F_{(1,28)} = 9.39$, $P < 0.005$). The adiposity index and the gastrocnemius weight-TL ratio were calculated to assess the anabolic effect of ND and physical exercise on fat mass and muscle mass, respectively. While both ND treatment ($F_{(1,14)} = 16.64$, $P < 0.01$) and physical exercise ($F_{(1,14)} = 31.59$, $P < 0.001$) reduced the adiposity index, two way ANOVA indicated that only ND treatment ($F_{(1,22)} = 28.62$, $P < 0.001$) induced muscle hypertrophy in females. Additionally, the morphological monitoring of the estrus cycle during the treatment period revealed that ND rats exhibited persistent diestrus after the beginning of the treatment, whereas VEH-treated animals showed normal cyclicity. The effects of exercise training were assessed by measuring the blood lactate level after the end of each training section. No differences were observed in blood lactate concentrations between the exercised groups (VEH + EXC: 10.67 ± 0.85 ; ND + EXC: 9.10 ± 1.41 mmol/L; $t_{(14)} = 0.94$, $P = 0.36$), and in both cases the anaerobic threshold was reached (i.e. blood lactate level > 7.0 mmol/L).

Regarding the hormone levels (24–48 h after the last drug injection), chronic ND treatment ($F_{(1,15)} = 17.79$, $P = 0.001$), but not exercise ($F_{(1,15)} = 1.02$, $P = 0.32$) caused a significant decrease in serum levels of estradiol, without any interaction between those factors ($F_{(1,15)} = 0.55$, $P = 0.46$). Additionally, two way ANOVA indicated that the chronic ND treatment increased ($F_{(1,13)} = 164.3$, $P < 0.001$), but physical exercise decreased ($F_{(1,13)} = 27.95$, $P < 0.001$) the levels of testosterone, with a significant interaction between these factors ($F_{(1,13)} = 23.79$, $P < 0.001$).

3.1.2. Effects of ND treatment on vasodilator responses in sedentary and exercised female rats

The perfusion pressure of the MVBs isolated from female rats was similar in VEH- and ND-treated animals in both basal (VEH + SED: 29.8 ± 1.5 ; ND + SED: 33.3 ± 1.9 ; VEH + EXC: 30.7 ± 2.1 ; ND + EXC: 30.0 ± 2.5 ; mmHg) and after the NE-induced increase of the vascular tone (VEH + SED: 127.7 ± 7.1 ; ND + SED: 124.6 ± 6.0 ; VEH + EXC: 111.9 ± 5.0 ; ND + EXC: 121.0 ± 4.5 ; mmHg). As shown in Fig. 1A and Table 2, the ND treatment impaired the vascular reactivity of ACh-induced vasodilation of both sedentary and exercised female rats when compared to VEH-treated animals. The endothelium-dependent relaxation induced by ACh in MVBs were significantly lower in ND-treated animals (R_{\max} : ND + SED: 73.1 ± 2.9 ; ND + EXC: 72.6 ± 4.8 ; % relaxation) when compared to VEH-treated animals [R_{\max} : VEH + SED: 82.7 ± 2.1 ; VEH + EXC: 84.7 ± 2.8 ; % relaxation ($F_{(1,28)} = 10.40$, $P < 0.005$)]. The effect of ND treatment in the dose-dependent relaxation induced by ACh was also observed in the AUC analyses [VEH + SED: 339.4 ± 7.5 ; ND + SED: 301.4 ± 17.6 %; VEH + EXC: 350.8 ± 9.4 ; ND + EXC: 284.4 ± 23.2 %; ($F_{(1,28)} = 10.94$, $P < 0.01$); * $P < 0.05$ vs VEH + SED; ** $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ vs VEH + EXC]; AU; Fig. 1A, inset]. Exercise training alone or in combination with ND treatment did not cause any changes neither in AUC, nor in R_{\max} induced by ACh. There were no changes in pD_2 values among groups for any of the studied drugs (Table 2).

3.1.3. Investigation of the mechanisms underlying the impairment of vascular reactivity mediated by ND treatment in female rats

To address the involvement of products generated by NOS, EDHF, and PGs activities in ND-impaired endothelium-dependent relaxation in MVBs, we examined ACh-induced responses in the absence or presence of specific inhibitors.

3.1.3.1. Effect of NOS antagonism on endothelium-dependent relaxation. Nitric Oxide modulation of ACh-induced relaxation was evaluated using AG and L-NAME treatments. The Two-way ANOVA revealed that ND treatment ($F_{(1,28)} = 4.62$, $P = 0.04$) and exercise ($F_{(1,28)} = 5.03$, $P = 0.03$), but not the interaction between them ($F_{(1,28)} = 0.58$, $P = 0.45$) influenced the ACh-induced responses after iNOS inhibition by AG. The AG treatment of MVBs did not cause alterations in ACh-induced relaxation in the VEH-groups, however in the ND + SED group the relaxation was significantly attenuated (Fig. 1B, Table 2). Interestingly, exercise training prevented the alterations caused by ND treatment in ND + EXC group (Fig. 1B, Table 2). The participation of NO from iNOS in the ACh-induced relaxation is represented by the dAUC values before and after AG treatment of MVBs [dAUC%: VEH + SED: -7.74 ± 1.0 ; ND + SED:

Table 1

Biometric characteristics and hormone levels from vehicle sedentary group (VEH + SED), Nandrolone Decanoate (ND)-sedentary group (ND + SED), vehicle-exercise group (VEH + EXC), and ND-exercise group (ND + EXC).

	VEH + SED	ND + SED	VEH + EXC	ND + EXC
Initial Body weight (g)	199.2 \pm 3.4	199.7 \pm 5.1	198.7 \pm 3.6	195.0 \pm 4.5
Final Body Weight (g)	278.6 \pm 6.5	323.8 \pm 6.9**	274.0 \pm 13.0	320.8 \pm 8.4***
Weight gain (%)	43.4 \pm 4.2	68.9 \pm 4.3***	46.8 \pm 5.6	65.5 \pm 4.7**
Food intake (g)	20.8 \pm 0.9	20.4 \pm 0.9	19.3 \pm 0.7	20.8 \pm 0.8
Uterus/TL (mg/cm)	140.0 \pm 10.8	190.4 \pm 10.5**	126.9 \pm 20.8	205.0 \pm 14.7***
Ovaries/TL (mg/cm)	34.2 \pm 2.1	27.5 \pm 2.8	33.0 \pm 1.6	26.0 \pm 2.0*
Gastrocnemius/TL (mg/cm)	406.4 \pm 18.4	527.7 \pm 19.3***	414.4 \pm 20.5	488.3 \pm 14.4***
Adiposity Index (%) ¹	5.32 \pm 0.3	3.31 \pm 0.3**	2.88 \pm 0.2**	2.6 \pm 0.1**
Estradiol (pg/mL)	52.0 \pm 3.4	30.5 \pm 2.8***	62.9 \pm 10.9	32.1 \pm 1.0***
Testosterone (ng/mL)	0.2 \pm 0.01	2.8 \pm 0.2***	0.1 \pm 0.01	1.3 \pm 0.11***

Values are means \pm S.E.M. ¹Body fat mass (g)/final body weight (g) \times 100. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ vs. VEH + SED group; *** $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ vs. VEH + EXC group; ² $P < 0.01$ vs. ND + SED group (two-way ANOVA followed by Fisher's test), $n = 8$ per group. TL, tibia length.

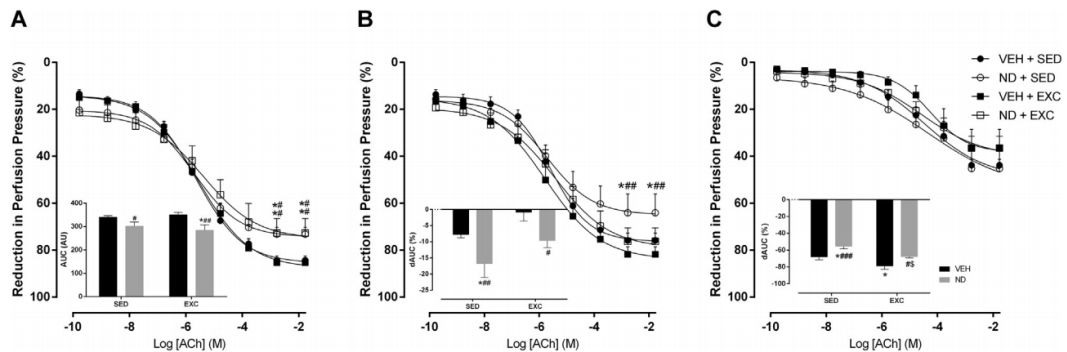


Fig. 1. Effects of ND treatment on endothelium-dependent and NO-mediated ACh-induced relaxation in sedentary and exercised female rats. Dose-response curves for ACh were determined in mesenteric vascular beds (MVBs) pre-contracted with noradrenaline (NE) in (A) absence of inhibitors, in presence of (B) aminoguanidine (AG) or (C) N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Inset figures show the (A) area under the dose-response curve (AUC), (B) differences in the area under the dose-response curves (dAUC%) before and after the presence of AG, and (C) dAUC% before and after the presence of L-NAME. These data provide information about the magnitude of the participation of NO in ACh-induced relaxation. The responses are expressed as the percentage of reduction in the perfusion pressure relative to the pre-constrictions induced by NE. Each point represents the mean of 8 experiments \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. VEH + SED group; ** $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ vs. VEH + EXC group; § $P < 0.05$ vs. ND + SED group by two-way ANOVA followed by Fisher's test.

Table 2

Maximum response (R_{\max}) and sensitivity (pD_2) of the dose-response curves to acetylcholine in the MVBs.

	Control		AG		L-NAME		L-NAME + INDO	
	R_{\max}	pD_2	R_{\max}	pD_2	R_{\max}	pD_2	R_{\max}	pD_2
VEH + SED	82.7 \pm 2.1	5.97 \pm 0.1	75.8 \pm 3.0	5.81 \pm 0.1	43.7 \pm 6.6	4.95 \pm 0.2	37.4 \pm 5.5	5.13 \pm 0.1
ND + SED	73.1 \pm 2.9 [#]	6.03 \pm 0.1	64.0 \pm 5.2 ^{##}	6.16 \pm 0.2	45.1 \pm 3.8	5.24 \pm 0.2 [#]	44.3 \pm 7.1	5.13 \pm 0.2
VEH + EXC	84.7 \pm 2.8	5.90 \pm 0.1	81.7 \pm 3.2	5.94 \pm 0.1	36.3 \pm 7.7	4.49 \pm 0.2	24.5 \pm 5.2	5.01 \pm 0.2
ND + EXC	72.6 \pm 4.8 [#]	6.13 \pm 0.2	76.1 \pm 3.2 [§]	6.11 \pm 0.2	36.4 \pm 4.9	5.22 \pm 0.1 [#]	35.0 \pm 6.6	4.81 \pm 0.2

The results are the means \pm S.E.M. of 8 experiments. R_{\max} , maximal response (expressed as the percentage of the maximum relaxation induced by ACh); pD_2 , $-\log$ one-half R_{\max} ; $n = 8$ per group. AG, aminoguanidine; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; INDO, indomethacin. Statistical significance is indicated by * $P < 0.05$ vs. VEH + SED group; ** $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ vs. VEH + EXC group; § $P < 0.05$ vs. ND + SED group (two-way ANOVA followed by Fisher's test).

$-16.8 \pm 4.1^{***}$; VEH + EXC: -0.8 ± 2.7 ; ND + EXC: $-9.6 \pm 2.1^{*}$; ($F_{(1,28)} = 10.31$, $P < 0.01$ for treatment; $F_{(1,28)} = 6.4$, $P < 0.05$ for exercise); * $P < 0.05$ vs VEH + SED; ** $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ vs VEH + EXC; Fig. 1B, inset]. These findings suggest that ND treatment increased the iNOS participation in the relaxation responses compared to VEH groups, and exercise restored the alteration in this pathway induced by ND treatment. The pD_2 values for ACh-induced relaxation did not differ among all groups after AG treatment of MVBs (Table 2).

The L-NAME treatment of MVBs promoted a marked attenuation of ACh-induced relaxation (Fig. 1C) and no differences mediated by ND treatment or exercise were observed in the relaxation responses among the groups. Under these conditions, the dose-response curves shifted to the right in all groups, but this shift was smaller in preparations from ND-treated groups than VEH-treated groups, as shown by the pD_2 values [($F_{(1,28)} = 6.31$, $P = 0.018$ for treatment); Table 2]. Furthermore, the effects of a decreased NO-mediated relaxation in MVBs, mediated by the NOS inhibitor L-NAME, were greater in ND + SED and ND + EXC groups than VEH-treated groups, as shown by the dAUC values [($F_{(1,28)} = 12.77$, $P < 0.05$ for treatment; $F_{(1,28)} = 12.01$, $P < 0.05$ for exercise; $F_{(1,28)} = 0.04$, $P = 0.82$ for interaction); Fig. 1C, inset]. These results suggest that ND leads to an endothelial dysfunction in MVBs from female rats by reducing the NO component in the vascular relaxations induced by ACh. Even though the exercise training was able to promote an increase in the NO bioavailability in EXC-groups, this increase was not capable of rescuing the NO pathway in ND-treated group.

3.1.3.2. Effect of EDHF and COX inhibition on endothelium-dependent relaxation. To investigate the putative role of EDHF on the impairment of vascular reactivity mediated by ND treatment in female rats, the MVBs were treated with L-NAME plus INDO to prevent the formation of NO and vasoactive prostanoids, respectively. As shown in Fig. 2A, the inhibition of NOS and prostanoid pathways, leaving the EDHF as the only intact pathway, promoted a pronounced attenuation in the relaxation to ACh in both VEH- and ND-treated female rats, without any difference between these groups. Likewise, neither ND treatment nor exercise induced changes in both R_{\max} and sensitivity of the MVBs to ACh (Table 2), indicating that the EDHF-mediated relaxation was similar in all groups. The magnitude of EDHF participation in the ACh-induced relaxation can also be shown by the AUC values (Fig. 2A, inset).

To investigate whether the PGs are involved in the ND-induced changes in vascular reactivity to ACh, we assessed the dAUC (%) values in the presence of L-NAME and after inhibition with both L-NAME and INDO, which indicates the magnitude of the involvement of PGs in the relaxation response. No differences were observed between groups when comparing the dAUC (%) (Fig. 2B). In addition, neither ND treatment nor exercise induced incremental changes in R_{\max} or pD_2 of the dose-response curves assessed in the presence of L-NAME plus INDO (Table 2). These results are indicative of a non-expressive participation of prostanoids in the ACh-induced relaxation response in the MVBs of the studied groups. Overall, these data imply that ND treatment does not affect prostanoid or EDHF components of relaxation, but impairs the NO pathway of endothelial relaxation.

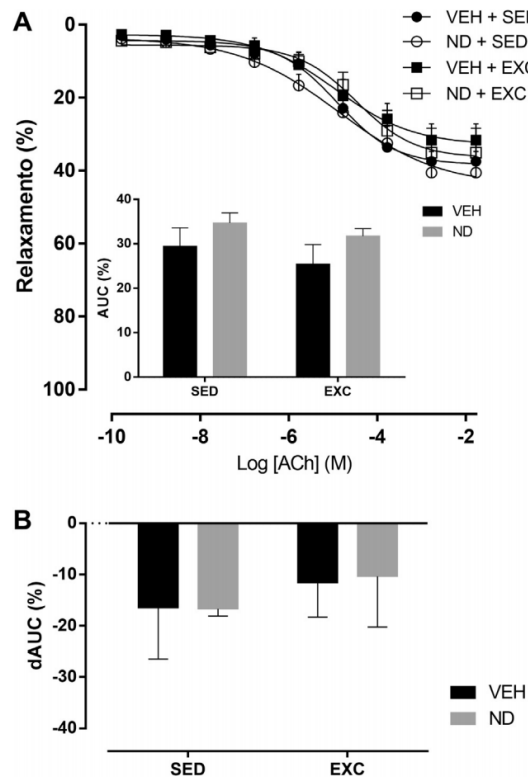


Fig. 2. Effects of ND treatment on EDHF- and prostanoid-mediated ACh-induced relaxation in the MVBs from female rats. MVBs from sedentary and exercised female rats were pre-contracted with NE in presence of (A) N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) plus indomethacin. The inset figure shows the area under the dose-response curves (AUC%) after the double blockade, which provides information about the magnitude of the participation of EDHF in ACh-induced relaxation. In (B) the role of prostanoids in MVB relaxation is represented by dAUC% between the groups in the presence of L-NAME and after inhibition with L-NAME plus indomethacin. The responses are expressed as the percentage of reduction in the perfusion pressure relative to the pre-contractions induced by NE. Each point represents the mean of 8 experiments \pm S.E.M.

3.1.4. Effects of ND treatment on NOS, Akt, and NADPH oxidase expression in the MVBs from sedentary and exercised female rats

To further examine the influence of ND treatment on NO pathway, we analyzed the protein expression of iNOS, eNOS, Akt and NADPH oxidase in the MVBs from female rats. Western blot analyses of mesenteric vessels lysates showed that ND treatment led to a marked reduction of eNOS phosphorylation [($F_{(1,17)} = 6.43$, $P < 0.05$ for treatment); Fig. 3A] and to an increase of iNOS expression when compared to VEH-treated groups [($F_{(1,17)} = 10.06$, $P < 0.01$ for treatment); Fig. 3B]. Moreover, we investigated whether ND induced the activation and/or the phosphorylation of Akt, which is known to activate eNOS in vascular endothelial cells. We observed that ND reduced the activation of Akt in the mesenteric vessels lysate, as shown by the phospho/total Akt protein expression [($F_{(1,17)} = 6.08$, $P < 0.05$ for treatment); Fig. 3C]. Additionally, we evaluated the effects of ND treatment on gp91^{phox} protein expression, a subunit of the NADPH oxidase complex, which is a source of superoxide anion production in endothelium. The expression of gp91^{phox} subunit was augmented in ND-treated females when compared to VEH-groups [($F_{(1,16)} = 5.12$, $P < 0.05$ for treatment);

Fig. 3D]. Exercise training alone or its interaction with ND treatment did not cause any changes in all proteins analyzed ($P > 0.05$).

3.2. Experiment 2: High doses of Nandrolone Decanoate induce vascular dysfunction in females similar to the alterations observed in estrogen deficiency model

In this second set of experiments, we focused to determine if ND treatment of female rats was sufficient to reproduce the estrogen deficiency-induced vascular dysfunctions. Therefore, we compared the effects of ND-treated to ovariectomized female rats on MVBs function.

3.2.1. Animal characteristics and circulating hormone levels in ND-treated and ovariectomized female rats

The data referring to body weight, organs weight-to-TL ratio and sexual hormone levels are summarized in Table 3. All animals that underwent ovariectomy showed increased in body weight gain and decreased uterine weight-TL ratio when compared to SHAM group (Table 3). These findings demonstrate that the complete removal of the ovaries was successful and that the lack of ovarian hormones led to the uterine atrophy, a highly estrogen-sensitive tissue.

As reported in experiment 1, ND treatment caused a significant decrease in serum levels of estradiol, which is similar to the effect observed in OVX female rats ($F_{(2,10)} = 9.45$, $P < 0.01$), and an increase in the levels of testosterone ($F_{(2,9)} = 79.30$, $P < 0.001$). Compared to SHAM group, ND-treated rats had a significant increase in the body weight gain ($F_{(2,21)} = 11.00$, $P < 0.001$) and in uterine weight-TL ratio ($F_{(2,21)} = 125.2$, $P < 0.001$), and a reduction in the ovaries weight-TL ratio ($t_{(2)} = 2.81$, $P < 0.05$) at the end of the treatment. These results highlight the effects of the androgenization mediated by AAS treatments in females, and reveal a similar pattern of alterations between females receiving doses of ND and OVX animals. No differences were found in the adiposity index and in the gastrocnemius muscle weight-TL ratio between SHAM and OVX, but ND-treated females showed reduced fat mass and increased muscle weight-TL ratio, indicating the anabolic effects of the AAS treatment.

3.2.2. Evaluation of vascular reactivity in ND-treated and ovariectomized female rats

Fig. 4 summarizes the data of dose-response curves obtained in conditions of normal or endothelium-derived vasoactive factors inhibitors. Perfused MVBs isolated from ND-treated and OVX female rats exhibited significantly altered responsiveness to ACh ($F_{(2,21)} = 6.66$, $P < 0.01$), indicative of vascular dysfunction (Fig. 4A). The females with low levels of circulating estradiol showed a significant attenuation in the vascular relaxation responses (R_{max} : SHAM + ND: 73.1 ± 2.9 ; OVX: 67.0 ± 3.0 ; % relaxation) when compared to SHAM animals (R_{max} : SHAM: 84.0 ± 3.2 ; % relaxation; Table 4). Likewise, the effects of AAS treatment and ovariectomy on ACh dose-response curves in MVBs from female rats are also demonstrated in the AUC analyses [($F_{(2,21)} = 4.45$, $P < 0.05$); Fig. 4A inset]. No differences in ACh sensitivity were seen in any of the groups (Table 4).

The effects of endothelium-derived vasoactive factors in the ACh-elicited relaxation responses are illustrated in the panel of Fig. 4. The estrogen deficiency state induced by ND treatment and ovariectomy lead to a decrease of NO-mediated relaxations in resistance vessels of female rats. While the MVBs treatment with AG, but not L-NAME, significantly reduced the concentration-induced relaxation to ACh in both SHAM + ND and OVX groups compared to SHAM control group (Fig. 4B and C, and Table 4), opposite effects mediated by these NOS inhibitors were observed in the dAUC (%). Our results showed that whereas there was an

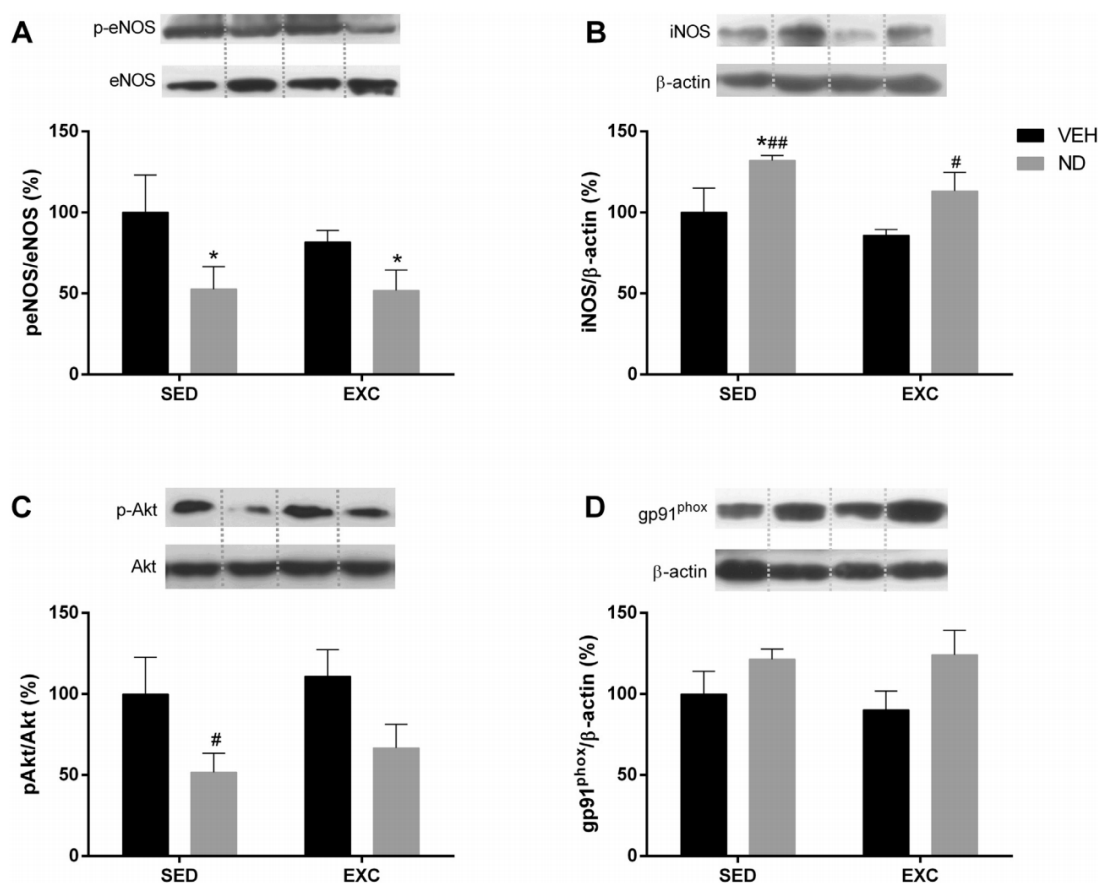


Fig. 3. Effect of ND treatment on the expression of signaling pathway proteins. Western blot analysis of (A) eNOS, (B) iNOS, (C) Akt and (D) NADPH oxidase (gp91^{phox}) in the mesenteric arteries (upper panels, representative blots). The column graphs refer to the densitometry analysis of the bands normalized to (A) total eNOS (C) total Akt or (B,D) β -actin expression. Each column represents the mean of 5 experiments \pm S.E.M., and the results are expressed as the percentage of the VEH + SED group. * P < 0.05 vs. VEH + SED group; *** P < 0.01 and # P < 0.05 vs. VEH + EXC group by two-way ANOVA followed by Fisher's test.

Table 3

Biometric characteristics and hormone levels from SHAM (SHAM), SHAM-treated with Nandrolone Decanoate (ND) (SHAM + ND), and Ovariectomized (OVX) groups.

	SHAM	SHAM + ND	OVX
Initial Body weight (g)	196.2 \pm 5.0	199.7 \pm 5.1	201.7 \pm 4.1
Final Body Weight (g)	283.8 \pm 5.7	323.8 \pm 6.9**	312.2 \pm 4.9**
Weight gain (%)	44.0 \pm 4.3	68.9 \pm 4.3**	59.6 \pm 2.6**
Food intake (g)	20.1 \pm 2.1	20.4 \pm 0.9	20.8 \pm 0.6
Uterus/TL (mg/cm)	128.4 \pm 6.4	190.4 \pm 10.5***	28.3 \pm 2.7**
Ovaries/TL (mg/cm)	37.4 \pm 2.0	27.5 \pm 2.8	–
Gastrocnemius/TL (mg/cm)	406.4 \pm 18.4	527.7 \pm 19.3***	453.3 \pm 13.3
Adiposity Index (%) ¹	5.32 \pm 0.3	3.31 \pm 0.3***	4.86 \pm 0.2
Estradiol (pg/mL)	54.3 \pm 4.5	30.5 \pm 2.8**	32.5 \pm 5.4**
Testosterone (ng/mL)	0.21 \pm 0.01	2.84 \pm 0.2***	0.17 \pm 0.02

Values are means \pm S.E.M. ¹Body fat mass (g)/final body weight (g) \times 100. ** P < 0.01 and * P < 0.05 vs. SHAM group; *** P < 0.01 and vs. OVX group (one-way ANOVA followed by Fisher's test), n = 8 per group. TL, tibia length. Note that SHAM + ND (experiment 2) and ND + SED (experiment 1) are the same group. ND + SED was renamed to assist readers to compare groups in experiment 2.

increased participation of iNOS in the ACh-induced relaxation of MVBs from SHAM + ND and OVX groups (Fig. 4B, inset), the overall involvement of NO component in the vascular responses was reduced in both estrogen deficient groups (Fig. 4C, inset). In

contrast to L-NAME, inhibition of COX with INDO did not affect the response to ACh in the studied groups, as demonstrated by comparing both the DAUC (%) and the R_{max} in the presence of only L-NAME and in the presence of both L-NAME plus INDO (Fig. 4D and E, and Table 4). In addition, neither the treatment with ND nor ovariectomy caused changes in the EDHF-mediated ACh-induced relaxation in the isolated MVBs (Fig. 4D).

4. Discussion

The results of this study support our hypothesis that high doses of ND alters the endothelial function of resistance vessels in both sedentary and exercised female rats. Our major findings show that ND (i) impairs vascular reactivity most likely mediated by alterations in the endothelium-dependent NO-pathway, (ii) induces changes in the expression and activation of proteins that can modulate the vascular tone, (iii) induces functional changes in the MVBs similar to those found in ovariectomized animals, and (iv) leads to physiological and vascular alterations that are not improved by physical exercise. Overall, our study provides new data that help uncover the role of AAS modulating endothelial function in females in the CV disease caused by steroids abuse.

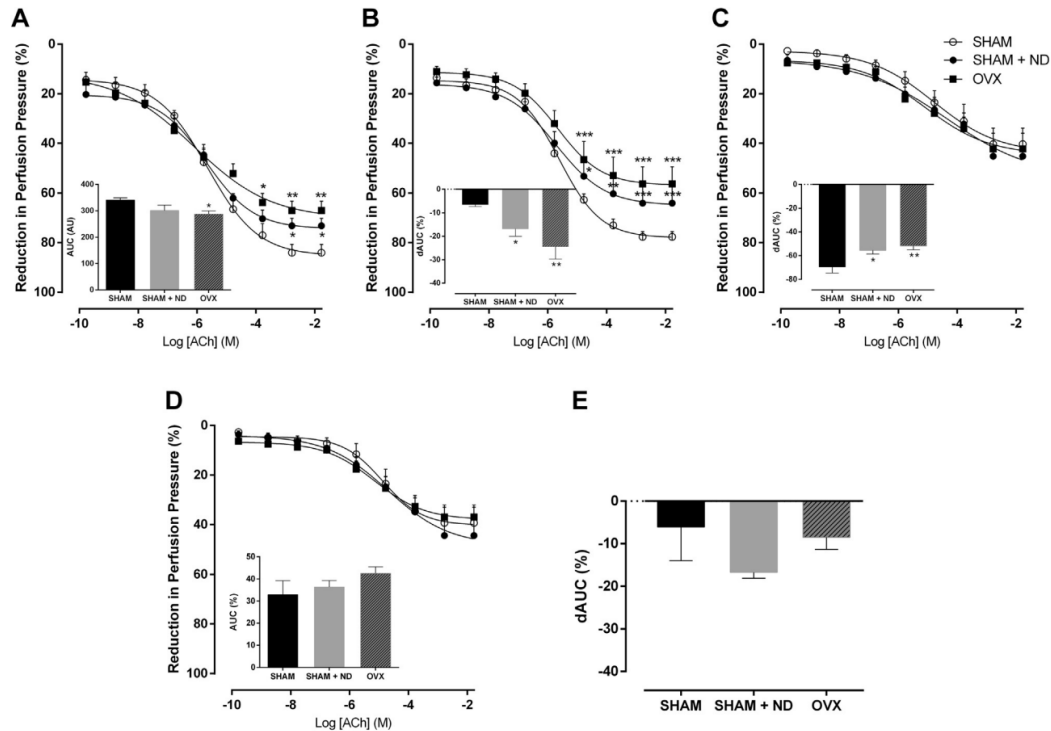


Fig. 4. Effects of ND treatment on the dose-response curve of ACh-induced relaxation in the absence and presence of pharmacological inhibitors. (A) Dose-response curve for ACh was determined in mesenteric vascular beds (MVBs) in absence of inhibitors. The inset figure shows the area under the dose-response curve (AUC). MVBs were pre-contracted with NE in presence of (B) aminoguanidine (AG), (C) N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or (D) L-NAME plus indomethacin. The inset figures show (B) differences in the area under the dose-response curves (dAUC%) before and after the presence of AG, (C) dAUC% before and after the presence of L-NAME and (D) the area under the dose-response curves (AUC%) before and after the double blockade. In (E) the role of prostanooids in MVB relaxation is represented by dAUC% between the groups in the presence of L-NAME and after inhibition with L-NAME plus indomethacin. The ACh-induced responses are expressed as the percentage of reduction in the perfusion pressure relative to the pre-contractions induced by NE. Each point represents the mean of 8 experiments \pm S.E.M. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ vs. SHAM group; by one- or two-way ANOVA followed by Fisher's test.

Table 4
Maximum response (R_{max}) and sensitivity (pD_2) of the dose-response curves to acetylcholine in the MVBs.

	Control		AG		L-NAME		L-NAME + INDO	
	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2
SHAM	84.0 ± 3.2	5.96 ± 0.1	77.6 ± 2.0	5.84 ± 0.1	40.2 ± 6.4	5.23 ± 0.2	39.2 ± 6.2	5.11 ± 0.2
SHAM + ND	$73.1 \pm 2.9^*$	6.03 ± 0.1	$64.0 \pm 5.2^*$	6.16 ± 0.2	45.1 ± 3.8	5.24 ± 0.2	44.3 ± 7.1	5.13 ± 0.2
OVX	$67.0 \pm 3.0^{**}$	6.43 ± 0.2	$53.6 \pm 5.6^{**}$	5.83 ± 0.2	42.2 ± 6.2	5.44 ± 0.2	36.8 ± 7.9	4.44 ± 0.2

The results are the means \pm S.E.M. of 8 experiments. R_{max} , maximal response (expressed as the percentage of the maximum relaxation induced by acetylcholine); pD_2 , $-\log$ one-half R_{max} ; $n = 8$ per group. AG, aminoguanidine; L-NAME, N^G -nitro-L-arginine methyl ester; INDO, indomethacin. Statistical significance is indicated by * $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ vs. SHAM group (one-way ANOVA followed by Fisher's test).

Focusing in a translational approach, the anaerobic nature of the resistance training protocol used in this study was chosen aiming to reproduce the muscle-enhancing series commonly used by both men and women AAS users [50,51]. Despite of the favorable effects of exercise training on the musculoskeletal system (or in different systems) [52], our findings indicate that the resistance training did not produce an adaptive vascular response in the MVBs nor did it prevent the alterations in the vascular responses caused by ND in female rats.

Although a few reports did not describe alterations in vascular responses of adult male rodents exposed to ND [14,53], our data corroborates other previous clinical and experimental studies

suggesting that AAS contributes to impair vascular reactivity [21,22,25] in different conductance or resistance vessels from male subjects. Our research group has previously shown that treatment with ND led to the development of hypertension without impairment of vascular reactivity in male wistar rats under similar treatment regimen used here [14]. In the current study, we found that ND altered the ACh-induced endothelium-dependent dilation in MVBs from both sedentary and exercised female rats, suggesting that the vascular effects of AAS are sex-specific and the influence of the hormonal milieu between male and females could result in distinct consequences of AAS use for these populations. While we cannot discern whether the negative vascular effects observed

in ND-treated females are due to a direct effect of ND or to an indirect effect of serum levels of testosterone, our data also suggest that the reduction of circulating levels of estradiol in ND treated-females could lead to an impairment of vascular reactivity. The relevance of estrogen-deficient state in the CV system are well-recognized, with implications in the development of several vascular alterations in both animals and humans [40,54]. The possible mechanism by which androgens can lead to a reduction in estrogen levels is via the activation of a negative feedback loop of both follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), as demonstrated by Bordbar and cols. (2014) [55]. In addition, ND treatment caused an ovarian hypotrophy that could also be related to the reduction in the serum levels of estradiol and the estrous acyclicity, widely reported by others [13,56,57]. Interestingly, our data show that the persistence in diestrous phase as well as the increase in body weight found in ND-treated females are similar to the alterations in estrogen-deficiency caused by ovariectomy.

The most remarkable finding of our study is that NO-induced vasodilation was significantly reduced in ND-treated females when compared to VEH group, suggesting a marked impairment of endothelial NO function in a vascular bed that contribute substantially to peripheral vascular resistance [58]. Under our experimental conditions, the NO-inhibitor L-NAME markedly attenuated relaxation in all groups; however, the magnitude of the effect of L-NAME (% dAUC) was lower in both ND + SED and ND + EXC groups. Altogether, these data indicate that there was a reduction in the activity of the NO pathway in the AAS treated groups. Similar results were described by Chinnathambi and cols. (2013, 2014) [24,59], who reported that pregnant and nonpregnant rats with prenatal testosterone exposure had the NO component of ACh relaxation significantly impaired in mesenteric arteries.

Interestingly, the alterations in NO-component induced by ND treatment are similar to those observed in the MVBs from OVX rats. In addition to the similar vascular responses to ACh detected in both OVX and SHAM + ND groups, we also observed that the magnitude of the effect of L-NAME (%dAUC) was lower in these estrogen-deficient groups compared to the control SHAM female rats. The reduced bioavailability of NO as major cause of endothelial dysfunction in ovariectomized rats has been previously described by us [44,46,47] and others [60,61] and highlights the interplay between NO and estrogen levels. Thereby, this data support that estrogen deficiency could be an important factor mediating vascular dysfunction in ND-treated females.

Nandrolone-mediated impairment in the MVB reactivity was accompanied by decreased phosphorylation of eNOS (Ser¹¹⁷⁷) and Akt (Ser⁴⁷³) in mesenteric vessels from both sedentary and exercised treated females, suggesting reduction in the activity state of both eNOS and Akt in these groups. Ser¹¹⁷⁷ eNOS phosphorylation site is the major regulator of NO production in the systemic vasculature [62] and is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase–protein kinase B (PI3K/Akt) pathway, amongst others. Nandrolone is reported to modulate Akt pathway in different tissues [63,64], but to our knowledge, here we show for the first time that high doses of ND are able to reduce the activation of Akt in vasculature, and therefore eNOS activation, leading to decreased NO formation. It is worth mentioning that once ND also diminishes circulating levels of estrogen, we cannot determine whether the reductions in eNOS (Ser¹¹⁷⁷) and Akt (Ser⁴⁷³) phosphorylation are due to a direct effect of ND or to reductions in endogenous estrogen since the latter hormone is well-known to stimulate phosphorylation of eNOS and Akt [65,66]. Moreover, while evidences show that resistance training can increase NO bioavailability [67], ours and other results [68,69] further demonstrate that this increase is directly determined by different resistance training protocols and intensities.

Under physiological conditions, eNOS activity is the major contributor to NO production in the vasculature [70]. iNOS, whose

expression is rarely detected in vascular endothelial and smooth muscle cells under physiological conditions [71], may have its expression increased after either inflammatory or cytokine stimulation, which has been shown to contribute to vascular damage and oxidative stress [72,73]. Our results demonstrate that in the presence of iNOS inhibitor AG, the ACh-induced relaxation of MVBs from ND + SED group was significantly attenuated, but AG did not modify the response in the ND-EXC and VEH-treated groups. These physiological phenomena were confirmed by molecular data, evidencing that long-term administration of ND can stimulate iNOS expression in mesenteric arteries from female rats. Altogether, our findings indicate a higher putative participation of NO from iNOS in the ACh-relaxation responses in ND-treated female rats, alteration interestingly prevented by resistance exercise. However, the contribution of iNOS was not able to compensate the NO-deficiency in ND-treated females, once these animals showed reduced relaxation responses to ACh. Our data are in accordance with others authors who observed high doses of AAS stimulating inflammatory cascades in different tissues [74,75]. Remarkably, however, some reports suggest that elevated levels of testosterone have a positive impact in iNOS, inhibiting its expression in macrophages [76]. On the other hand, studies using ovariectomized rats show that iNOS expression is elevated and may impair vascular responses [47,77]. This supports the concept that estrogen-deficiency may be a key mechanism by which ND induces vascular dysfunction in females. Consistently, our data also show that OVX and SHAM + ND females have an impairment in ACh-induced relaxation in the presence of AG.

Reinforcing the hypothesis that the reduction of NO bioavailability is involved in the impaired vascular responses in the AAS group, we also showed an increase in the expression of NADPH oxidase subunit gp91^{phox} in mesenteric vessels from ND-treated females. The role of increased generation of reactive oxygen species (ROS) underlying endothelial dysfunction and decreasing NO bioavailability [78,79] is well recognized, and attention has been drawn to NADPH oxidase, the main source of oxidative stress in the cardiovascular system [79]. Not only androgens are known to induce oxidative stress [25], but also some oxidant defense enzymes, such as glutathione peroxidase and glutathione reductase, have been shown to have decreased activity after ND treatment [74]. Conversely, other endogenous anti-oxidants, e.g. catalase and MnSOD, were not altered by ND in aortic segments of male rats [25]. Recently, Frankenfeld and cols. (2014) [80] described that the alterations induced by ND in the mRNA expression of NADPH oxidase are tissue-specific in males after 8 weeks of treatment, supporting our results of ND inducing oxidative stress in mesenteric vessels from females.

In addition, it was demonstrated that neither EDHF nor prostanoid components of relaxation were altered by ND, physical exercise, or estrogen deficiency in MVBs from female rats. The inhibitory effect of L-NAME on ACh-induced relaxation was not modified by the COX blockade, based on pharmacological analysis using indomethacin. Moreover, the residual dilation after blocking NO/PGs pathways (L-NAME + INDO) revealed that EDHF contributes substantially to MVBs relaxation, supporting earlier finding [81], even though this factor was not altered amongst all the studied groups. Despite of being demonstrated that sex hormones appear to modulate these two relaxing factors [82,83], variations in the EDHF and/or PGs have been attributed to the use of different arterial types, estrogen-status or androgens levels [37,59,77,84].

In summary, the present study offers new insights into the cardiotoxic effects of ND. Our study indicate that chronic ND treatment induces endothelial dysfunction, which alters vascular responsiveness by a mechanism that involves NO pathway and possibly increased oxidative stress. Moreover, results presented here evidenced that exercise training was not able to offer a vascu-

lar protective effect in females under AAS regimen. Finally, our findings raise the possibility that ND treatment increases the risk for vascular injury in this gender, a response that could predispose to cardiovascular diseases. Even though we provided a parallel mechanism focusing on the outcome of estrogen deficiency in ND treated females, we cannot exclude the putative role of AR in the vascular alterations observed in our experiments. The negative outcomes of ND and other AAS treatments in the CV system in both male and females could be potentially reduced by the use of selective androgen receptor modulators (SARMs). Even though these tissue-selective AR ligands are still not commercially available, clinical trials are currently being conducted and have demonstrated superior safety profiles when compared to some AASs. Nonetheless, large clinical trials are necessary to confirm if these AAS-induced alterations are maintained in a long period of regimen and after the drug withdrawal.

Declarations of interest

None of the authors has any disclosures to make and we report no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, n 54688175/2011) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Casadinho/PROCAD -5526231-2011/3). We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and UFES for support.

References

- [1] S. Basaria, J.T. Wahlstrom, A.S. Dobs, Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 5108–5117, <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.11.7983>.
- [2] G. Kanayama, J.I. Hudson, H.G. Pope, Illicit anabolic-androgenic steroid use, *Horm. Behav.* 58 (2010) 111–121, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.006>.
- [3] G. Kanayama, J.I. Hudson, H.G. Pope, Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: a looming public health concern?, *Drug Alcohol Depend.* 98 (2008) 1–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2008.05.004>.
- [4] A.S. Clark, L.P. Henderson, Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27 (2003) 413–436, [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00064-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00064-2).
- [5] H.G. Pope, G. Kanayama, A. Athey, E. Ryan, J.I. Hudson, A. Baggish, The lifetime prevalence of anabolic-androgenic steroid use and dependence in Americans: current best estimates, *Am. J. Addict.* 23 (2014) 371–377, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1521-0391.2013.12118.x>.
- [6] M.E. Eisenberg, M. Wall, D. Neumark-Sztainer, Muscle-enhancing behaviors among adolescent girls and boys, *Pediatrics* 130 (2012) 1019–1026, <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2012-0095>.
- [7] L.D. Johnston, P.M. O'Malley, J.G. Bachman, J.E. Schulenberg, Monitoring the Future national survey results on drug use, 1975–2012, Secondary school students, Vol. I, Natl. Inst. Drug Abus. Univ. Michigan, 2013.
- [8] D.L. Elliot, J. Cheong, E.L. Moe, L. Goldberg, Cross-sectional study of female students reporting anabolic steroid use, *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161 (2007) 572–577, <http://dx.doi.org/10.1001/archpedi.161.6.572>.
- [9] A. Urhausen, T. Albers, W. Kindermann, Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible?, *Heart* 90 (2004) 496–501, <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2003.015719>.
- [10] W.W. Franke, B. Berendonk, Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government, *Clin. Chem.* 43 (1997) 1262–1279.
- [11] F.C. Wu, Endocrine aspects of anabolic steroids, *Clin. Chem.* 43 (1997) 1289–1292.
- [12] C.A.A. Penatti, J.G. Oberlander, M.C. Davis, D.M. Porter, L.P. Henderson, Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters activity and synaptic function in neuroendocrine control regions of the female mouse, *Neuropharmacology* 61 (2011) 653–664, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.008>.
- [13] L.B. Belardin, V.A. Simão, G.A.A. Leite, L.G. de A. Chuffa, I.C.C. Camargo, Dose-dependent effects and reversibility of the injuries caused by nandrolone decanoate in uterine tissue and fertility of rats, *Birth Defects Res. (Part B)* 101 (2014) 168–177, <http://dx.doi.org/10.1002/bdrb.21104>.
- [14] J.V.M. Franquini, A.M. Do Nascimento, E.M. De Lima, G.A. Brasil, O.A. Heringer, K.O. dos S. Cassaro, T.V.P. Da Cunha, C. Musso, M.C.L.F. Silva Santos, I.C. Kalil, D. C. Endringer, G.A.P. Boechat, N.S. Bissoli, T.U. De Andrade, Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension, *Steroids* 78 (2013) 379–385, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.12.009>.
- [15] A.S. Maior, A.R. Carvalho, S.R. Marques-Neto, P. Menezes, P.P. Soares, J.H.M. Nascimento, Cardiac autonomic dysfunction in anabolic steroid users, *Scand. J. Med. Sci. Sports* 23 (2013) 548–555, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0838.2011.01436.x>.
- [16] M.J.N. Nunes Alves, M.R. Dos Santos, R.G. Dias, C.A. Akiho, M.C. Laterza, M.U.P. B. Rondon, R.L. De Moraes Moreau, C.E. Negrão, Abnormal neurovascular control in anabolic androgenic steroids users, *Med. Sci. Sports Exerc.* 42 (2010) 865–871, <http://dx.doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181c07b74>.
- [17] P.P. Pereira-Junior, E.A. Chaves, R.H. Costa-e-Sousa, M.O. Masuda, A.C. Campos de Carvalho, J.H.M. Nascimento, Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid, *Eur. J. Appl. Physiol.* 96 (2006) 487–494, <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-005-0111-7>.
- [18] F.L. Rocha, E.C. Carmo, F.R. Roque, N.Y. Hashimoto, L.V. Rossoni, C. Frimm, I. Anéas, C.E. Negrão, J.E. Krieger, E.M. Oliveira, Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (2007) H3575–H3583, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01251.2006>.
- [19] A. Sandoo, J.J.C.S.V. van Zanten, G.S. Metsios, D. Carroll, G.D. Kitas, The endothelium and its role in regulating vascular tone, *Open Cardiovasc. Med. J.* 4 (2010) 302–312, <http://dx.doi.org/10.2174/1874192401004010302>.
- [20] D. Versari, E. Daghini, A. Virdis, L. Ghiadoni, S. Taddei, Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease, *Diabetes Care* 32 (Suppl 2) (2009) S314–S321, <http://dx.doi.org/10.2337/dc09-S330>.
- [21] M. Ferrer, A. Encabo, J. Marin, G. Balfagón, Treatment with the anabolic steroid, nandrolone, reduces vasoconstrictor responses in rabbit arteries, *Eur. J. Pharmacol.* 258 (1994) 103–110, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90062-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(94)90062-0).
- [22] H.A. Lane, F. Grace, J.C. Smith, K. Morris, J. Cockcroft, M.F. Scanlon, J.S. Davies, Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids, *Eur. J. Clin. Invest.* 36 (2006) 483–488, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01667.x>.
- [23] C.F. Ebenbichler, W. Sturm, H. Gänzer, J. Bodner, B. Mangweth, A. Ritsch, A. Sandhofer, M. Lechleitner, B. Föger, J.R. Patsch, Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male bodybuilders taking anabolic-androgenic steroids, *Atherosclerosis* 158 (2001) 483–490.
- [24] V. Chinnathambi, M. Balakrishnan, J. Ramadoss, C. Yallampalli, K. Sathishkumar, Testosterone alters maternal vascular adaptations: role of the endothelial NO system, *Hypertension* 61 (2013) 647–654, <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00486>.
- [25] M. Sun, W. Shen, M. Zhong, P. Wu, H. Chen, A. Lu, Nandrolone attenuates aortic adaptation to exercise in rats, *Cardiovasc. Res.* 97 (2013) 686–695, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvs423>.
- [26] J. Nakao, W.C. Change, S.I. Murota, H. Orimo, Testosterone inhibits prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture, *Atherosclerosis* 39 (1981) 203–209.
- [27] E.A. Chaves, P.P. Pereira-Junior, R.S. Fortunato, M.O. Masuda, A.C.C. de Carvalho, D.P. de Carvalho, M.F. Oliveira, J.H.M. Nascimento, Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99 (2006) 223–230, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.01.004>.
- [28] C.M. Kuhn, Anabolic steroids, *Recent Prog. Horm. Res.* 57 (2002) 411–434.
- [29] E.T. Howley, Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity, *Med. Sci. Sports Exercise* 33 (2001) S364–S370.
- [30] A.L. Sindler, M.D. Delp, R. Reyes, G. Wu, J.M. Muller-Delp, Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles, *J. Physiol.* 587 (2009) 3885–3897, <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172221>.
- [31] G.L. Jennings, L. Nelson, M.D. Esler, P. Leonard, P.I. Korner, Effects of changes in physical activity on blood pressure and sympathetic tone, *J. Hypertens. Suppl.* 2 (1984) S139–S141.
- [32] M. Miyachi, H. Kawano, J. Sugawara, K. Takahashi, K. Hayashi, K. Yamazaki, I. Tabata, H. Tanaka, Unfavorable effects of resistance training on central arterial compliance: a randomized intervention study, *Circulation* 110 (2004) 2858–2863, <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000146380.08401.99>.
- [33] M.M. Mota, T.L.T.B. da Silva, M.T. Fontes, A.S. Barreto, J.E. dos S. Araújo, A.C.C. de Oliveira, R.B. Wichi, M.R.V. Santos, Resistance exercise restores endothelial function and reduces blood pressure in type 1 diabetic rats, *Arq. Bras. Cardiol.* 103 (2014) 25–32.
- [34] H. Kawano, M. Tanimoto, K. Yamamoto, K. Sanada, Y. Gando, I. Tabata, M. Higuchi, M. Miyachi, Resistance training in men is associated with increased arterial stiffness and blood pressure but does not adversely affect endothelial function as measured by arterial reactivity to the cold pressor test, *Exp. Physiol.* 93 (2008) 296–302, <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2007.039867>.
- [35] L.R.G. Castor, E. Oba, O.C.M. Pereira, Effects of swimming and nandrolone decanoate treatment on vas deferens response to norepinephrine, *Life Sci.* 85 (2009) 541–545, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2009.08.009>.

- [36] M.A. Sader, K.A. Griffiths, R.J. McCredie, D.J. Handelsman, D.S. Celermajer, Androgenic anabolic steroids and arterial structure and function in male bodybuilders, *J. Am. Coll. Cardiol.* 37 (2001) 224–230.
- [37] J.M. Orshal, R.A. Khalil, Gender, sex hormones, and vascular tone, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286 (2004) R233–R249, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00338.2003>.
- [38] M.A. Sader, D.S. Celermajer, Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system, *Cardiovasc. Res.* 53 (2002) 597–604.
- [39] F. Epstein, M.E. Mendelsohn, R.H. Karas, The protective effects of estrogen on the cardiovascular system, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 1801–1811, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199906103402306>.
- [40] D. Xing, S. Nozell, Y.-F. Chen, F. Hage, S. Oparil, Estrogen and mechanisms of vascular protection, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 289–295, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.182279>.
- [41] I.O. Obasanjo, T.B. Clarkson, D.S. Weaver, Effects of the anabolic steroid nandrolone decanoate on plasma lipids and coronary arteries of female cynomolgus macaques, *Metabolism* 45 (1996) 463–468.
- [42] R.J. McCredie, J.A. McCrohon, L. Turner, K.A. Griffiths, D.J. Handelsman, D.S. Celermajer, Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens, *J. Am. Coll. Cardiol.* 32 (1998) 1331–1335.
- [43] A.S. Leopoldo, A.P. Lima-Leopoldo, A.F. Nascimento, R.A.M. Luvizotto, M.M. Sugizaki, D.H.S. Campos, D.C.T. Da Silva, C.R. Padovani, A.C. Cicogna, Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49 (2016) e5028, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20155028>.
- [44] I.F. Caliman, A.Z. Lamas, P.L.M. Dalpiaz, A.R.S. Medeiros, G.R. Abreu, S. Gomes Figueiredo, L. Nascimento Gusmão, T. Uggere Andrade, N. Souza Bissoli, Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are restored by atorvastatin therapy in ovariectomized rats, *PLoS One* 8 (2013) e80892, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080892>.
- [45] J.J. Dalle Lucca, A.S. Adeagbo, N.L. Alsip, Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed, *Hum. Reprod.* 15 (2000) 961–968.
- [46] P.W.C. Oliveira, G.J. de Sousa, I.F. Caliman, A.Z. Lamas, A.R.S. de Medeiros, T.U. de Andrade, G.R. de Abreu, S.G. de Figueiredo, N.S. Bissoli, Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats, *Clin. Sci. (Lond)* 275 (2014) 265–275, <http://dx.doi.org/10.1042/CS20130553>.
- [47] A.Z. Lamas, I.F. Caliman, P.L.M. Dalpiaz, A.F. de Melo, G.R. Abreu, E.M. Lemos, S. A. Gouvea, N.S. Bissoli, Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats, *Life Sci.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.004>.
- [48] F.A. Voltarelli, C.A. Gobatto, M.A.R. de Mello, Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 1389–1394.
- [49] U. Tegtbur, M.W. Busse, K.M. Braumann, Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise, *Med. Sci. Sports Exerc.* 25 (1993) 620–627.
- [50] G.S. Goldfield, Body image, disordered eating and anabolic steroid use in female bodybuilders, *Eat Disord.* 17 (2009) 200–210, <http://dx.doi.org/10.1080/10640260902848485>.
- [51] D.G. Barceloux, R.B. Palmer, Anabolic-androgenic steroids, *Dis. Mon.* 59 (2013) 226–248, <http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.03.010>.
- [52] M.L. Pollock, B.A. Franklin, G.J. Balady, B.L. Chaitman, J.L. Fleg, B. Fletcher, M. Limacher, I.L. Pin, R.A. Stein, M. Williams, T. Bazzarre, Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: an advisory from the committee on exercise, rehabilitation, and prevention, council on clinical cardiology, American Heart Association, *Blood Press.* 8721 (2000) 828–833, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7117.2009.00028.x>.
- [53] T.S. Cunha, M.J.C.S. Moura, C.F. Bernardes, A.P. Tanno, F.K. Marcondes, Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment, *Hypertension* 46 (2005) 1010–1015, <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.0000174600.51515.e7>.
- [54] A.A. Knowlton, A.R. Lee, Estrogen and the cardiovascular system, *Pharmacol. Ther.* 135 (2012) 54–70, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.007>.
- [55] H. Bordbar, F. Mesbah, T. Talaie, F. Dehghani, H. Mirkhani, Modulatory effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a stereological study, *Iran. J. Med. Sci.* 39 (2014) 44–50.
- [56] J.R. Gerez, F. Frei, I.C.C. Camargo, Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment, *Contraception* 72 (2005) 77–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.contraception.2005.02.001>.
- [57] L.G. de Almeida Chuffa, R.B. de Souza, F. Frei, S. de Fátima Paccola Mesquita, I.C. Camargo, Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus, *Anat. Rec. (Hoboken)* 294 (2011) 335–341, <http://dx.doi.org/10.1002/ar.21314>.
- [58] K.L. Christensen, M.J. Mulvany, Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats, *J. Vasc. Res.* 30 (1993) 73–79.
- [59] V. Chinnathambi, C.S. Blessen, K.L. Vincent, G.R. Saade, G.D. Hankins, C. Yallampalli, K. Sathishkumar, Elevated testosterone levels during rat pregnancy cause hypersensitivity to angiotensin II and attenuation of endothelium-dependent vasodilation in uterine arteries, *Hypertension* 64 (2014) 405–414, <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03283>.
- [60] C.M. Wong, X. Yao, C.L. Au, S.Y. Tsang, K.P. Fung, I. Laher, P.M. Vanhoutte, Y. Huang, Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats, *Vascul. Pharmacol.* 44 (2006) 290–298, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2005.12.005>.
- [61] A.J. LeBlanc, R. Reyes, L.S. Kang, R.A. Dailey, J.N. Stallone, N.C. Moninga, J.M. Muller-Delp, Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297 (2009) R1713–R1723, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00178.2009>.
- [62] S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, A.M. Zeiher, Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature* 399 (1999) 601–605, <http://dx.doi.org/10.1038/21224>.
- [63] C. Penna, F. Tullio, M.G. Perrelli, F. Moro, G. Abbadesse, F. Piccione, V. Carriero, S. Racca, P. Pagliaro, Ischemia/reperfusion injury is increased and cardioprotection by a postconditioning protocol is lost as cardiac hypertrophy develops in nandrolone treated rats, *Basic Res. Cardiol.* 106 (2011) 409–420, <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-010-0143-y>.
- [64] R. Sirianni, C. Capparelli, A. Chimento, S. Panza, S. Catalano, M. Lanzino, V. Pezzi, S. Andò, Nandrolone and stanozolol upregulate aromatase expression and further increase IGF-I-dependent effects on MCF-7 breast cancer cell proliferation, *Mol. Cell. Endocrinol.* 363 (2012) 100–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.002>.
- [65] M. Florian, Y. Lu, M. Angle, S. Magder, Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation, *Steroids* 69 (2004) 637–645, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2004.05.016>.
- [66] K.L. Chambliss, P.W. Shaul, Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase, *Endocr. Rev.* 23 (2002) 665–686, <http://dx.doi.org/10.1210/er.2001-0045>.
- [67] G.S. Galdino, C.H. Xavier, R. Almeida, G. Silva, M.A. Fontes, G. Menezes, I.D. Duarte, A.C. Perez, The Nitric oxide/CGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats, *Int. J. Neurosci.* 125 (2015) 765–773, <http://dx.doi.org/10.3109/00207454.2014.970256>.
- [68] M.M. Mota, T.R.R. Mesquita, T.L.T.B. da Silva, M.T. Fontes, S.L. Santos, L. Dos Santos Aggum Capettini, I.C.G. de Jesus, L.J.Q. Júnior, K. De Angelis, R.B. Wichi, M.R.V. Santos, Endothelium adjustments to acute resistance exercise are intensity-dependent in healthy animals, *Life Sci.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.007>.
- [69] N.A. Güzel, S. Hazar, D. Erbas, Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males, *J. Sports Sci. Med.* 6 (2007) 417–422.
- [70] S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 109–142.
- [71] F. Wu, K. Tymi, J.X. Wilson, INOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells, *J. Cell. Physiol.* 217 (2008) 207–214, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21495>.
- [72] Y. Xia, J.L. Zweier, Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 6954–6958.
- [73] A. Chatterjee, J.D. Catravas, Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiological regulation, *Vascul. Pharmacol.* 49 (2008) 134–140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2008.06.008>.
- [74] I. Riezzo, E. Turillazzi, S. Bello, S. Cantatore, D. Cerretani, M. Di Paolo, A.I. Fiaschi, P. Frati, M. Neri, M. Pedretti, V. Fineschi, Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF- α mediated apoptosis in the kidneys of CD1 treated mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280 (2014) 97–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.031>.
- [75] M.A.E. Ahmed, Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 282 (2015) 285–296, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.12.007>.
- [76] R. Friedl, M. Brunner, T. Moeslinger, P.G. Spieckermann, Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages, *Life Sci.* 68 (2000) 417–429, [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00953-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00953-X).
- [77] S. Nawate, M. Fukao, I. Sakuma, T. Soma, K. Nagai, O. Takikawa, S. Miwa, A. Kitabatake, Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy, *Br. J. Pharmacol.* 144 (2005) 178–189, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706091>.
- [78] U. Förstermann, Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease, *Pflügers Arch.* 459 (2010) 923–939, <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-010-0808-2>.
- [79] H. Cai, D.G. Harrison, Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress, *Circ. Res.* 87 (2000) 840–844, <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.87.10.840>.
- [80] S.P. Frankenfeld, L.P. Oliveira, V.H. Ortenzi, I.C.C. Rego-Monteiro, E.A. Chaves, A. C. Ferreira, A.C. Leitão, D.P. Carvalho, R.S. Fortunato, The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male Wistar rats, *PLoS One* 9 (2014) e102699, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102699>.
- [81] M.Y. Liu, Y. Hattori, M. Fukao, A. Sato, I. Sakuma, M. Kanno, Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle, *Br. J. Pharmacol.* 132 (2001) 1035–1046, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0703899>.

- [82] M.-Y. Liu, Y. Hattori, A. Sato, R. Ichikawa, X.-H. Zhang, I. Sakuma, Ovariectomy attenuates hyperpolarization and relaxation mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor in female rat mesenteric artery: a concomitant decrease in connexin-43 expression, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 40 (2002) 938–948.
- [83] A.P. Dantas, R. Scivoletto, Z.B. Fortes, D. Nigro, M.H. Carvalho, Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats, *Hypertension* 34 (1999) 914–919.
- [84] M. Wakasugi, T. Noguchi, Y.I. Kazama, Y. Kanemaru, T. Onaya, The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI₂) by vascular tissues, *Prostaglandins* 37 (1989) 401–410.